

TÂNIA DE LIMA PACHECO PESSATTI

**EFEITO DA INJEÇÃO DE AP5 NA SUBSTÂNCIA
CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL EM RATOS SUBMETIDOS
AO LABIRINTO EM T-ELEVADO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez

Florianópolis – SC

1999

**“EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE AP5 NA SUBSTÂNCIA
CINZENTA PERIAQUETUDAL DORSAL EM RATOS
SUBMETIDOS AO LABIRINTO EM T-ELEVADO**

POR

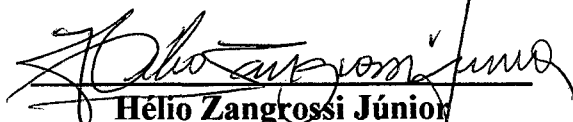
TÂNIA DE LIMA PACHECO PESSATI

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final pela Banca Examinadora em
sessão de defesa pública em 08 de Junho
de 1999.**

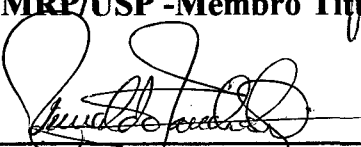
Banca Examinadora:



**Antonio de Pádua Carobrez
(FMC/UFSC-Membro Titular)**



**Hélio Zangrossi Júnior
(FMRP/USP - Membro Titular)**



**Reinaldo Naoto Takahashi
(FMC/UFSC-Membro Titular)**



**Giles Alexander Rae
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC**

Florianópolis, 08 de Junho de 1999.

PESSATTI, Tânia de Lima Pacheco. **Efeito da microinjeção de AP5 na substância cinzenta periaquedutal dorsal em ratos submetidos ao labirinto em T-elevado.** Florianópolis, 1999, 58 pp. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez

Defesa: 08/06/99

A participação do receptor NMDA, presente na substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd), na modulação da ansiedade experimental e memória em ratos, foram avaliados no labirinto em T elevado (LTE). Este labirinto consiste de um braço aberto e dois braços fechados, com dimensões similares, e utiliza a esquiva inibitória e a fuga, respectivamente, para avaliar o medo condicionado e medo incondicionado. Os resultados mostraram um efeito ansiolítico, expresso pela diminuição da esquiva inibitória e da avaliação do risco, uma medida adicional que evidenciou a ansiólise obtida. O tratamento também prejudicou a aquisição e a evocação do comportamento condicionado de esquiva inibitória sem, no entanto, ter prejudicado a consolidação da memória. Com a injeção realizada 72 horas após, constatou-se uma diminuição da esquiva inibitória, traduzida como um prejuízo na evocação da memória. Foi averiguada também uma participação SCPd na aquisição da esquiva inibitória, sugerindo-se um possível papel dessa estrutura na memória emocional.

**“ Adquire sabedoria, adquiere inteligência,
e não te esqueças nem te apartes das
palavras do Senhor.”**

(Provérbios 4:5)

A minha filha Luiza e ao meu marido Marcos, pelo estímulo constante.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Antônio de Pádua Carobrez pela paciência da orientação e incentivo à pesquisa;

Aos professores da Coordenadoria Especial de Farmacologia em especial ao Prof. Dr. Giles Alexander Rae, pela contribuição à minha formação científica e pela amizade e à Prof^a. Dr^a. Thereza Lima Nogueira, pelo encorajamento e apoio;

Aos funcionários da Coordenadoria Especial de Farmacologia;

Ao Prof. Dr. Cláudio A. Toledo e funcionários do laboratório de fisiologia do Centro de Ciências da Saúde da UFSC, pelo auxílio na etapa histológica desse trabalho;

Aos colegas do curso, em especial à Irinéia, Vânia, Nelson e Ubirajara pela colaboração, amizade e companheirismo incondicional;

Aos meus familiares em especial ao meu pai Rubens (*in memoriam*) e minha mãe Marli; meu irmão Ederson; minha irmã e sempre companheira Daniele; aos meus sogros, por serem meus segundos pais;

Enfim a todos aqueles que de uma maneira ou outra colaboraram.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
 INTRODUÇÃO	 1
1. ANSIEDADE	2
2. AMINOÁCIDOS EXCITATÓRIOS.....	7
3. MODELOS ANIMAIS.....	11
4. APRENDIZADO E MEMÓRIA.....	13
 OBJETIVOS	 21
OBJETIVO GERAL.....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
 MATERIAIS & MÉTODOS	 22
1. ANIMAIS	22
2. DROGAS E SOLUÇÕES	22
3. CÂNULAS	23
4. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	23
5. MICROINJEÇÃO INTRACEREBRAL	24
6. LABIRINTO EM T ELEVADO (LTE)	25
7. PADRÕES COMPORTAMENTAIS:	
ESQUIVA INIBITÓRIA, FUGA E TENTATIVA	26
8. HISTOLOGIA	27
9. ESTATÍSTICA	28
 RESULTADOS	 29
1. LOCALIZAÇÃO HISTOLÓGICA	29
2. EFEITO DA INJEÇÃO DE AP-5 INJETADO PREVIAMENTE À	
AQUISIÇÃO DA ESQUIVA INIBITÓRIA	30
3. EFEITO DA INJEÇÃO DE AP-5 MICROINJETADO POSTERIORMENTE	
ÀS SESSÕES DE AQUISIÇÃO DA ESQUIVA INIBITÓRIA	33

4. EFEITO DO AP-5 INJETADO PREVIAMENTE AO TESTE	36
DISCUSSÃO	39
CONCLUSÕES.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXOS (TABELAS)	65

RESUMO

RESUMO

A ansiedade em animais é um distúrbio caracterizado por um conjunto de respostas comportamentais neurovegetativas, expressado na forma de medo. Esse comportamento tem sido avaliado no labirinto em T elevado (LTE), um modelo recente composto de um braço aberto e dois braços fechados, com dimensões similares, e que utiliza a esquiva inibitória e a fuga, respectivamente, como padrões avaliativos do medo condicionado e do medo incondicionado. Uma segunda etapa, realizada 72 horas após, tem mostrado que ratos podem lembrar do comportamento aprendido, fenômeno que estimulou a utilização deste modelo para uma segunda investigação, a memória.

A substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) é uma estrutura mesencefálica que está envolvida na manutenção de estados motivacionais de animais, destacando-se a ansiedade.

Assim, foi injetado na SCPd de ratos submetidos ao LTE, entre 3 e 12 nmol de AP-5, um antagonista do receptor NMDA, nas seguintes condições: injeção pré-aquisição, injeção imediatamente após a aquisição, e injeção prévia ao teste, realizado 72 horas após a aquisição.

Os resultados mostraram um efeito ansiolítico, expressado pelo aumento da esquiva inibitória e por uma diminuição da avaliação do risco, uma medida adicional que evidenciou a ansiólise obtida. Com isto, a hipótese de participação de AAE na ansiedade foi confirmada.

O tratamento também prejudicou a aquisição e a evocação do comportamento condicionado de esquiva inibitória sem, no entanto, ter prejudicado a consolidação da memória. Com a injeção realizada 72 horas após, constatou-se uma diminuição da esquiva inibitória, traduzida como um prejuízo na evocação da memória. No entanto, como o efeito ansiolítico é verificado se utilizando a mesma medida, os resultados obtidos sobre a memória podem não ter sido exclusivamente relacionados à este parâmetro.

Foi averiguada também uma íntima relação entre a ansiedade e a memória, além de um envolvimento da SCPd na aquisição da esquiva inibitória. No entanto, trabalhos futuros se fazem necessários, no sentido de investigar a participação da SCPd no efeito emocional (anulação ou suplantação do medo) e no efeito cognitivo, com posterior integração destes efeitos sobre a ansiedade e sobre a memória.

ABSTRACT

ABSTRACT

Anxiety is a disorder which is characterized by a set of responses expressed in the form of fear. This behavior has been assessed by the so-called "Elevated T Maze," a recent model consisting of one open arm and two closed arms, with similar dimensions and which uses both inhibitory avoidance and escape, respectively, in order to assess the conditioned fear as well as the unconditioned fear. A second stage carried out 72 hours later, has shown that rats may recall the apprehended behavior, a phenomenon which has stimulated the use of such a model for a second investigation: the memory.

The dorsal periaqueductal gray substance (dPAG) is a mesencephalic structure integral to the aversive cerebral system, which represents the main neuronal substrate of anxiety.

Thus, between 3 to 12 nmol of AP-5 have been injected into the dPAG of rats that were submitted to the LTE, an antagonist to the NMDA receptor, under the following conditions: pre-acquisition injection, injection immediately after acquisition, and injection prior to test, performed 72 hours after acquisition.

The results have shown an anxiolytic effect, expressed by the reduction of inhibitory avoidance and the assessment of the risk, an additional measure which has evidenced the anxiolysis achieved.

The treatment has also impaired the acquisition and the evocation of the conditioned behavior of inhibitory avoidance without having impaired, however, the

consolidation of the memory. With the injection being performed 72 hours later, a reduction of inhibitory avoidance has been verified, being interpreted as an impairment in the evocation of the memory.

Moreover, a participation of the dPAG has been verified in the acquisition of inhibitory avoidance, suggesting a possible role of this structure in the emotional memory. Nevertheless, further study is necessary in order to investigate the dPAG's participation both in the emotional effect (voiding and supplanting of fear) and in the cognitive effect, with a later integration of these effects on the anxiety as well as on the memory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Receptor NMDA do glutamato	09
Figura 2 - Labirinto em T elevado	13
Figura 3 - Hipótese dos eventos moleculares durante a potenciação de longo prazo	17
Figura 4 - Secções frontais do atlas de Swanson (1992)	29
Figura 5 - Efeito das microinjeções de AP-5 5 minutos antes das sessões de aquisição, medidas em intervalos de 30 s	32
Figura 6 - Efeito do AP-5 microinjetado 5 minutos antes da aquisição, na SCPd na fuga aos braços abertos do LTE	33
Figura 7 - Efeitos das microinjeções de AP-5 feitas imediatamente após à aquisição, na esquiua inibitória dos braços abertos (A) e na avaliação do risco (B)	34
Figura 8 - Efeito do AP-5 microinjetado na SCPd na fuga aos braços abertos do LTE	35
Figura 9 - Efeitos das microinjeções de AP-5 na esquiua inibitória (A) e na avaliação do risco (B), no LTE	37
Figura 10 - Efeito do AP-5 microinjetado na SCPd na fuga aos braços abertos do LTE	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos receptores do glutamato encontrados em cérebro de mamíferos	10
Tabela 2 - Efeito do antagonista do receptor NMDA (AP-5) na esquiva inibitória	65
Tabela 3 - Efeitos do antagonista do receptor NMDA (AP-5) na avaliação do risco, no labirinto em T elevado	65
Tabela 4 - Comportamento de fuga na presença e ausência do antagonista do receptor NMDA (AP-5)	66
Tabela 5 - Efeito do antagonista do receptor NMDA (AP-5) na esquiva inibitória no labirinto em T elevado, com microinjeção pós-aquisição	66
Tabela 6 - Efeitos do antagonista do receptor NMDA (AP-5) na esquiva inibitória no labirinto em T elevado, com microinjeção pós-aquisição	66
Tabela 7 - Resposta de fuga, em teste realizado 72 horas após a sessão de aquisição, na presença ou ausência de AP-5, no LTE, com microinjeção pós-aquisição e pré-aquisição	67
Tabela 8 - Efeitos do antagonista do receptor NMDA (AP-5) na esquiva inibitória no labirinto em T elevado, com microinjeção pré teste	67
Tabela 9 - Efeito do antagonista do receptor NMDA (AP-5) na avaliação, com microinjeção pré-teste	67

LISTA DE ABREVIATURAS

AAE	Aminoácidos excitatórios
AMPA	α - amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
AP-5	Ácido-2-amino-fosfanopentanoico
GABA	Ácido gama-amino-butírico
GLU	Glutamato
LCE	Labirinto em cruz elevado
LTE	Labirinto em T elevado
LTP	Potenciação a longo prazo
NMDA	N-metil-D-aspartato
SCP	Substância cinzenta periaquedutal
SCPd	Substância cinzenta periaquedutal dorsal
IP	Intraperitoneal
MK-801	Dizolcipina
SNC	Sistema nervoso central

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

A mente humana, considerada terreno de grande enigmas, tem inspirado não só cientistas, mas também filósofos e poetas, a buscarem hipóteses capazes de desvendar o misterioso órgão que é o cérebro, e que também é considerado o mais complexo de toda a biologia (Beatty, 1995).

Na Grécia antiga, as primeiras idéias sobre o cérebro foram lançadas por Hipócrates (460-370 a.C.) e Demócrito (400 a.C.), os quais identificaram no crânio o centro de nossos pensamentos, e acreditavam ser o cérebro o responsável pelas emoções. Na mesma época, Platão comparou a memória a um bloco de cera em que ficavam gravadas as lembranças, e Shakespeare (1564-1616) chamou o cérebro de “frágil morada da alma”.

O pensamento grego, considerado a base da neurobiologia, foi complementado por Charles Darwin, William James e Sigmund Freud, que durante o século XIX pensaram e escreveram brilhantemente sobre a natureza da emoção, tornando a investigação do cérebro mais sistemática, de maneira a considerá-lo como modulador das emoções (Damasio, 1997).

A partir dessa época, inúmeras hipóteses de como o cérebro funcionaria foram lançadas; no entanto, uma proposta relacionada à neuropsicologia foi feita por Karl S. Lashley (1890-1958), o qual imaginava que uma espécie de “inscrição” aparecia no cérebro quando se aprendia alguma coisa. O trabalho de Lashley teve início com o desenvolvimento de um extenso programa concentrado na recuperação

da função após lesão cerebral. Seus experimentos enfocaram principalmente o córtex cerebral de ratos, e utilizavam um labirinto simples para mostrar as alterações comportamentais decorrentes de lesão cerebral (Lashley, 1917; 1929; 1950). Até hoje podemos dizer que Lashley estava no caminho certo, pois sabe-se que durante a aprendizagem a atividade cerebral é intensa em algumas regiões, vindo acompanhada de reações bioquímicas de síntese e de formação de potenciais diferenciados (Izquierdo & Medina, 1995; Carew, 1996; Martin e cols., 1997).

Assim, os estudos das funções cerebrais vêm avançando a passos largos e têm obtido revelações importantes sobre os mecanismos das emoções, e as formas de armazenamento e recuperação de informações nos arquivos da memória.

Por outro lado, a íntima relação que existe entre a memória e comportamento, tem mostrado a necessidade de se estudar, de maneira integrativa memória e ansiedade. Para isso, estudos sobre memória emocional parece representar bem esta integração. Além disso, estruturas cerebrais como a amígdala e o hipocampo, as quais tem papel importante na memória, também têm demonstrado participação nos processos de ansiedade .

1. ANSIEDADE

A ansiedade, de acordo com o "Longman dicionário de psicologia e psiquiatria" (1984), se refere a um conjunto de manifestações físicas e psicológicas, que tanto podem ser experimentadas por indivíduos sadios, como acompanhar ou caracterizar enfermidades. A ansiedade é vivenciada como uma apreensão a um perigo futuro não bem delineado (Uhde, 1984), e mais facilmente compreendida como sendo derivada de um estado emocional, o medo (Klein, 1980). Esta

apreensão pode ser relacionada a uma síndrome de respostas autonômicas características da espécie (Deakin e cols., 1994).

Inerente a esse conjunto de reações, o objetivo biológico em resposta de um perigo imediato visa proporcionar ao organismo a maior probabilidade possível de sobrevivência em determinada situação. Estas reações podem manifestar-se na forma de fuga, imobilidade (freezing), agressão (defesa agressiva) e submissão (Marks, 1987).

Apesar do medo ter um papel biológico importante, o pavor exagerado ou inadequado é causa de problemas psiquiátricos além da ansiedade, a síndrome do pânico, o estresse pós-traumático, distúrbio obsessivo-compulsivo. A ansiedade antecipatória generalizada é caracterizada, segundo DSM-IV como um quadro clínico, definido por uma ansiedade e preocupação excessivas, ocorrendo na maioria dos dias de um período de pelo menos seis meses. O distúrbio da ansiedade antecipatória generalizada parece desenvolver-se mais precocemente e ser mais insidioso do que o distúrbio do pânico (Graeff, 1993a).

Estudos realizados por Shemberg & Graeff (1978), os quais utilizaram estímulo elétrico na técnica de fuga por pressão à barra, verificaram uma diminuição da ansiedade em animais tratados com benzodiazepínicos, os resultados do trabalho levaram a uma conclusão sobre a relação do comportamento de defesa com ansiedade. Visto que, o medo em animais é expresso de forma semelhante aos humanos, possibilitou um avanço importante nas investigações sobre a ansiedade.

Outra reação manifestada pelo medo é a imobilidade, a qual pode ser uma resposta ao perigo quando a fuga não é possível ou não é útil (Adams, 1979). Ela pode ser apenas um estado de hipervigilância, intercalado com outros comportamentos, ou um estado de absoluta irresponsividade, com bradicardia e

queda da temperatura corporal. O estado de imobilidade tem o intuito de escapar à atenção do predador por um período que pode variar de segundos à vários dias (Marks, 1987).

No homem, um estado de paralisia consciente é descrito como resposta a estresse severo, como o relatado por sobreviventes de ataques por animais selvagens, bombardeios e vítimas de estupro (Suarez & Gallup, 1979). Estes eventos podem gerar um distúrbio de estresse pós-traumático, o qual consiste em reviver experiências perturbadoras, em forma de imagens do passado, que se referem ao trauma e que invadem involuntariamente a consciência (Graeff, 1993b).

O estudo da ansiedade em modelos animais tem proporcionado um vasto campo de pesquisa; no entanto, foi o advento da técnica de estereotaxia (Horsley & Clarke, 1908) que possibilitou o estudo mais direto das estruturas cerebrais, de maneira a relacioná-las aos padrões comportamentais estabelecidos pelos modelos.

As metodologias de estimulação elétrica usada por Ranson & Magnoun (1939), em gatos anestesiados, mostraram que certas regiões cerebrais, quando recebiam estimulação elétrica, induziam respostas mediadas pelo sistema nervoso simpático.

Em 1956, Hunsperger verificou que essas respostas comportamentais, denominadas de reação afetiva de defesa, eram obtidas quando se estimulava eletricamente uma área que se estendia desde a substância cinzenta da área pré-óptica até a substância cinzenta periaquedutal (SCP), sugerindo a participação desta estrutura em diferentes funções exercidas pelo sistema nervoso central (SNC).

Mais tarde, Adams (1989) também verificou que lesões na SCP de ratos produziam um prejuízo na resposta motora, sugerindo um envolvimento da SCP no sistema motor. Dados com gatos também foram semelhantes aos obtidos com ratos,

em virtude da lesão da SCP ter abolido repostas de defesa, incluindo vocalização, ataque e defesa (Kelly e cols., 1946). No entanto, estas lesões na SCP deviam ser completas, já que lesões parciais causavam aumento da defesa mais do que diminuição (Adams, 1989).

A substância cinzenta periaquedutal (SCP) é a região que circunda o aqueduto cerebral, chamado de aqueduto de Sylvius, e está anatomicamente localizada entre estruturas do rombencéfalo e o diencéfalo, ocupando desta forma uma posição intermediária entre vários sistemas sensoriais ascendentes e descendentes (Mantyh, 1982; Gerrits e cols., 1993).

Estudos morfológicos desta estrutura determinaram a existência de quatro regiões distintas: dorsal, dorso-lateral, ventro-lateral e medial, sendo que a porção mais rostral da SCP está localizada a nível de comissura posterior, e a porção mais caudal a nível de núcleo tegmental dorsal (Behbehani, 1995). Esta divisão foi empregada em estudos realizados por Mantyh (1982), que sugeriu também uma heterogeneidade das populações neuronais existentes na SCP. Estas análises foram realizadas em rato (Beitz e Shepard, 1985; Paxinos & Watson, 1986), coelho (Meller & Dennis, 1991), macaco (Mantyh, 1982) e humanos (Beitz, 1990). Pertencente a chamada área límbica mesencefálica, devido às conexões recíprocas que ali ocorrem, a SCP é formada por cinco principais tipos de células: neurônios fusiformes, neurônios multipolares, células estreladas, células piramidais e células ependimárias (Mantyh, 1982).

As projeções que partem da SCP se direcionam principalmente para o tronco cerebral, em especial para porções do bulbo (Bandler e cols., 1991), por duas rotas principais: a) através de feixe de fibras que distribui-se localmente para a própria SCP, para o *locus coeruleus* e para o núcleo de Barrington, e b) através do feixe

maior que tem um arranjo difuso na formação reticular da ponte, e uma distribuição limitada no bulbo onde ocupa uma posição dorso-lateral à pirâmide bulbar.

Estudos mais recentes têm mostrado a SCP organizada na forma de colunas neuronais que se estendem por várias distâncias ao longo do eixo rostro-caudal (Bandier e cols., 1991; Cameron e cols., 1995).

A SCP é uma estrutura bastante envolvida com o comportamento do medo (por conseguinte explorada no estudo da ansiedade. Da SCP, partem projeções ascendentes e descendentes que ligam esta estrutura a uma região importante como a amígdala (Fanselow, 1991), que confere um carácter emocional à resposta do medo.

Em relação à neurotransmissão na SCP, a serotonina, um importante neurotransmissor cerebral, também tem tido um importante papel nos estudos da ansiedade. A buspirona, um bloqueador dos receptores 5-HT_{1A}, mostrou-se eficaz no tratamento da ansiedade generalizada, assim a identificação e caracterização de múltiplos sítios da de ligação da 5-HT no tecido cerebral e a síntese de ligantes efetivos para esses receptores foi um grande avanço obtido em meados de 1980 (Gribel e cols, 1997).

Por outro lado, receptores gabaérgicos, também presentes na SCPd, exercem papel inibitório, de modo que estimulações elétricas na SCPd ou microinjeções que prejudiquem a neurotransmissão gabaérgica, induzem reações comportamentais como imobilidade alternada com fuga (Schmitt e cols., 1984).

O efeito inibitório proporcionado por agonistas dos receptores GABA_A é obtido através da abertura de canais de cloreto e está associado com o sítio de ligação para os benzodiazepínicos. Os receptores GABA_B, também com efeito inibitório pré- e pós-sináptico quando ligados ao modulador, estão associados indiretamente com

um canal de potássio e podem diminuir a condutância ao cálcio e inibir a produção de AMPc via proteína G (MacDonald e Olsen, 1994). Já o receptor GABA_C não tem seu mecanismo de ação bem conhecido. De acordo com o modelo de neurotransmissão gabaérgica, receptores benzodiazepínicos estão acoplados aos receptores GABA_A, mas não aos GABA_B (Haefely e cols., 1985).

2. AMINOÁCIDOS EXCITATÓRIOS

Os aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato) não só estão presentes em grande quantidade na SCP, como também são os neurotransmissores mais densamente encontrados no SNC (Greenamire & cols., 1994; Iversen, 1994; Robinson & Coyle, 1987). Atuam em praticamente todas as estruturas cerebrais através dos seus diversos tipos de receptores, como o AMPA (ácido propiônico α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol) e o NMDA (N-metil-D-aspartato). Uma das primeiras atividades documentadas referentes à participação destes aminoácidos no SNC, foi na reação de defesa demonstrada na década de 80, quando estes aminoácidos excitatórios evocaram respostas somáticas e autonômicas (Bandler, 1982; Graeff, 1988).

O glutamato, um agonista misto porque é capaz de ativar várias classes de receptores e cada uma delas com um perfil farmacológico e fisiológico distinto (Greenamyre e Porter, 1994), e está concentrado nas vesículas sinápticas por um processo dependente de adenosina-trifosfato e exerce sua ação fisiológica por várias vias, atuando em famílias distintas de receptores, localizados principalmente nos neurônios pós-sinápticos.

Técnicas de clonagem das subunidades do receptor do glutamato revelaram dois tipos de classes de receptor: metabotrópicos e ionotrópicos (Seeburg, 1993; Hollman & Heinemann, 1994; Wu e cols., 1996). Os receptores metabotrópicos do glutamato (mGluRs), os quais podem efetivamente ser ativados pelo ácido L-glutâmico, quisqualato e trans-1-amino-ciclopentil-1,3-dicarboxilato (tACPD), contêm geralmente sete domínios transmembrana. Estes receptores estão acoplados à proteína G, de forma que modulam a produção de segundos mensageiros (Paas, 1998).

Os receptores ionotrópicos do glutamato (iGluRs) são heterômeros ligados a canal iônico e apresentam quatro (Wu e cols., 1996) ou cinco (Wenthold e cols., 1992) subunidades. Estas subunidades conferem ao receptor NMDA propriedades fisiológicas e farmacológicas diferentes, além da variação da sensibilidade ao bloqueio pelo magnésio e a glicina, um coagonista do receptor NMDA (Danysz & Parsons, 1998). O antagonista competitivo do receptor NMDA, o ácido amino fosfonopentanoico (AP-5) se a um sítio, distinto do sítio do agonista, competindo apenas pela ocupação espacial das duas moléculas (Figura 1).

Baseados nas respostas obtidas com análogos seletivos do ácido L-glutâmico, subdividiu-se os iGluRs em três grupos: receptores AMPA iGluR₁₋₄ (ou iGluR_{A-D}); receptores Kainato (KA) iGluR₅₋₇, KA₁ e KA₂; e receptores NMDA (subunidades NR1 e NR2_{A-D}), conforme mostrado na tabela 1 (Greenamyre e Porter, 1994).

Outras subclasses de iGluR incluem kainato ligado a proteínas (KBPs), encontrados em anfíbios e que são menores do que os iGluR dos mamíferos, por apresentarem 400 aminoácidos a menos em sua estrutura. No entanto, nenhuma atividade de canal tem sido demonstrada no KBPs, de modo que eles são

considerados iGluR devido a sua alta homologia com receptores AMPA/KA (Hollman & Heinemann, 1994).

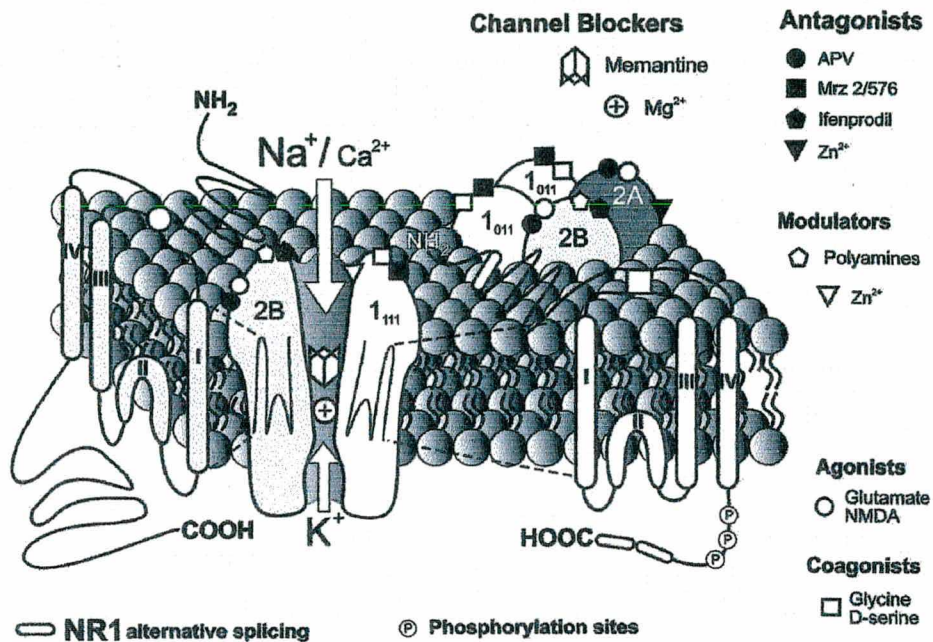


Figura 1: Desenho esquemático do receptor NMDA inserido na membrana plasmática. Fonte: Danysz & Parsons, 1998.

Em uma transmissão sináptica normal os canais do receptor NMDA estão bloqueados pelo íon magnésio, enquanto os receptores AMPA são capazes de transmissão. Um único neurônio pode expressar ambos os receptores, mas sua distribuição em sinapses individuais ainda não está clara (Paas, 1998; Beatty, 1995). Os receptores iGluRs modulam o fluxo passivo de íons sódio, potássio e cálcio através da membrana da célula, e medeiam não somente a transmissão rápida, mas também participam em vários processos plásticos, como modificação das conexões sinápticas e do *Long Term Potentiation* - LTP (Barnard, 1997). A ativação excessiva

destes receptores podem mediar a excitotoxicidade neuronal, de forma que são considerados participativos das desordens neurológicas e doenças cerebrais degenerativas (Solberg & Belkin, 1997).

Tabela 1: Classificação dos receptores do glutamato encontrados em cérebro de mamíferos.

CLASSES	RECEPTOR	SUBTIPO	DOMÍNIOS TRANS- MEMBRAN A	PROTEÍNA-G	SISTEMA DE TRANSDUÇÃO
I O N O T R Ó P I C O S	NMDA	NMDAR1	4	-	ligados a canais iônicos de Na ⁺ , K ⁺ e Ca ⁺⁺
		NMDAR2A	4	-	
		NMDAR2B	4	-	
		NMDAR2C	4	-	
		NMDAR2D	4	-	
	AMPA	GluR1	4	-	ligados a canais iônicos de Na ⁺ e K ⁺
		GluR2	4	-	
		GluR3	4	-	
		GluR4	4	-	
	Kainato	GluR5	4	-	
		GluR6	4	-	
		GluR7	4	-	
		KA1	4	-	
		KA2	4	-	
M E T A B O T R Ó P I C O S	Metabo- trópico	mGLUR1	7	Gq ou Gi/Go	ativam PLC
		mGLUR2	7	Gi/Go	inibem adenilato ciclase
		mGLUR3	7	Gi/Go	
		mGLUR4	7	Gi/Go	
		mGLUR5	7	Gq ou Gi/Go	
		mGLUR6	7	Gi/Go	

Abreviações: AMPA, ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilisoxazole-4-propiónico; AP-5, ácido 2-amino-5 fosfonopentanóico; NMDA, ácido N-metil-D-aspartico.
(Adaptado de Greenamyre & Porter, 1994).

3. MODELOS ANIMAIS

O condicionamento do medo, processo descoberto por Ivan Pavlov, é uma técnica experimental que tem possibilitado o estudo do controle do medo ou das reações de defesa pelo cérebro. Portanto, os efeitos comportamentais que são produzidos em animais por esta forma de estímulo neural, são similares em muitos aspectos aos utilizados no diagnóstico da ansiedade generalizada em humanos (Davis e cols., 1993). O medo condicionado é operacionalmente definido pela elevação da amplitude do medo na presença de um estímulo neutro (por exemplo luz), pareado com um estímulo condicionado (por exemplo choque).

Além do condicionamento, outro comportamento de medo, que também pode ser analisado no rato é a avaliação do risco. Estudos realizados por Blanchard & Blanchard (1988), mostraram que ratos selvagens analisados no aparelho experimental *Visible Burrow System*, constituído por uma arena central e um sistema de túneis subterrâneos, exibiam um comportamento de fuga característico, pela introdução do gato na arena central, seguido de inibição comportamental (acompanhada ou não de imobilidade). Após algum tempo da retirada do gato, os animais tornavam a se aproximar da arena central, de forma cautelosa, comportamento que foi chamado de avaliação do risco (*risk assessment*), que foi caracterizada como um comportamento expresso por um conjunto de respostas observadas em situações potencialmente perigosas. Em experimentos realizados com camundongos submetidos ao labirinto em zero, foi verificado que esta medida de avaliação do risco é mais sensível em detectar os efeitos modulatórios da ansiedade, por ligantes de receptores 5-HT, do que os parâmetros de esquia

inibitória dos braços abertos (Griebel e cols., 1996). Esta medida de avaliação do risco, também tem sido aplicada no labirinto em cruz elevado.

Os labirintos elevados, de uma forma geral, são modelos muito utilizados tanto para o estudo da ansiedade (Guimarães e cols., 1991; Rodgers & Cole, 1994; Griebel e cols., 1997), como o de memória (Flood e cols., 1995). O labirinto em cruz elevado, desenvolvido por Handley & Mithani (1984), tem adquirido popularidade nos últimos anos, e representa os paradigmas baseados nas respostas incondicionadas e na potencialização destas respostas a ambientes perigosos.

O labirinto em T elevado (LTE), proposto por Graeff e cols. (1993), foi desenvolvido a partir do labirinto em cruz elevado, e consiste em dois braços abertos e um braço fechado com as mesmas dimensões (figura 2). Neste modelo (LTE), além do comportamento de esquia e fuga dos braços abertos, outro comportamento analisado é a avaliação do risco, evidenciado também no labirinto em cruz elevado como tentativa de entrar para o lado aberto, ou seja, a aproximação cautelosa para o lado aberto; este comportamento no LTE é observado durante as sessões de esquia. Sanson & Carobrez (1998) demonstraram que, neste modelo experimental, os valores de avaliação do risco tendem a ser maiores em virtude da primeira exposição do rato no LTE, seguindo-se de um declínio nas demais sessões.

Em virtude das seguidas exposições no LTE, o rato tenta nas exposições seguintes esquivar-se do lado aberto, num comportamento conhecido como medo condicionado (Graeff & cols., 1994; Viana & cols., 1994; Zangrossi Jr. & Graeff, 1997). A preferência por lugares fechados e escuros, verificado em ratos e camundondos (Montgomery, 1955), faz com que as medidas de latência no compartimento fechado do labirinto sejam crescentes. Por outro lado, resultados

Devido o condicionamento ser uma forma de aprendizado, o medo gerado no labirinto em T elevado pode ser avaliado como medida de ansiedade e memória.

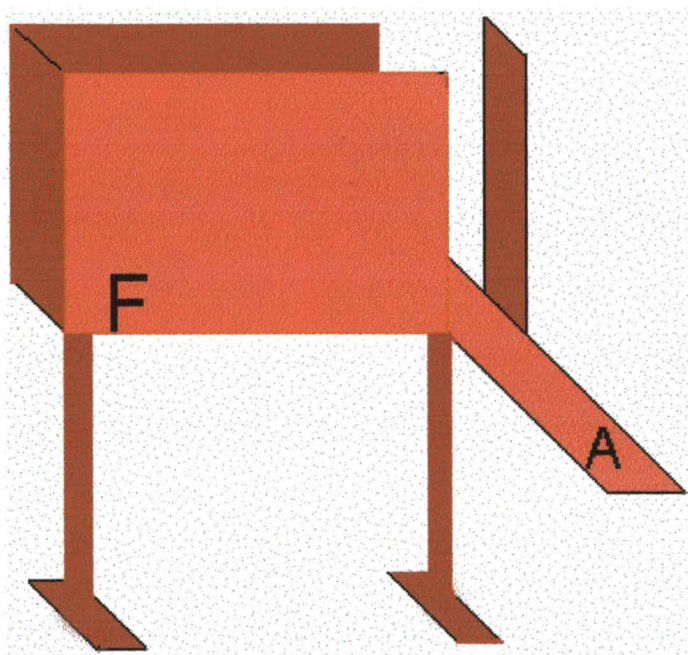


Figura 2: Labirinto em T elevado. As letras A e F representam o lado aberto e lado fechado, com os respectivos posicionamentos iniciais do animal para as medidas de latência de esquiva e fuga.

4. APRENDIZADO E MEMÓRIA

Em 1861, quando Paul Broca evidenciou que lesões na parte posterior do lobo frontal esquerdo do cérebro produziam defeito específico da linguagem, o pensamento científico sobre a neuroanatomia começou a tomar rumos diferentes.

De um modo geral, o entendimento sobre a neuroanatomia da memória está derivado de correlações clinico-patológicas em pacientes que representaram sinais

pensamento científico sobre a neu anatomia começou a tomar rumos diferentes.

De um modo geral, o entendimento sobre a neuroanatomia da memória está derivado de correlações clínico-patológicas em pacientes que representaram sinais de amnésia. Desde o paciente H.M., primeiro a ser descrito na literatura, pela neuropsicóloga Brenda Milner, a região do hipocampo tem sido a mais citada como envolvida neste processo (Moore e cols., 1996; Zanatta e cols., 1996; Amaral, 1987; Grabowska e cols., 1994; Tsien e cols., 1996; Morgan e Squire, 1993).

Estudos têm demonstrado que além do lobo temporal medial, áreas como o diencéfalo também provocam alterações na memória quando lesionados (Squire, 1987; Amaral, 1987). Historicamente, o diencéfalo tem sido designado como um foco secundário no estudo da amnésia; no entanto, apesar do conhecimento desta região ser menor do que o do lobo temporal, sabe-se que lesões no corpo mamilar de pacientes com síndrome de Korsakoff apresentam amnésia (Squire, 1987).

Estudos em macacos e em humanos têm possibilitado identificar outras estruturas do lobo temporal medial importantes para a formação da memória, como as áreas corticais adjacentes que são anatomicamente relacionadas com o hipocampo, especialmente córtex entorrinal, perirrinal e parahipocampal (Squire & Zola-Morgan, 1993).

Outra estrutura importante no processamento da memória e aprendizado é a amígdala, porção do sistema límbico implicada na emoção (Aggleton, 1992). Lesões na amígdala bloqueiam a expressão da resposta do medo condicionado, como a imobilidade (LeDoux e cols., 1990). Por outro lado, lesões na amígdala, realizadas após o treino, prejudicam a performance de retenção da esQUIVA passiva quando estas lesões são induzidas dois dias após o treino (Parent e cols., 1994). Assim, a

amígdala, juntamente com o hipocampo e o córtex entorrinal, participam na memória através de suas conexões com o córtex parietal e pré-frontal (Witter e cols., 1989).

Frente às evidências que indicam a participação da amígdala nos processos de memória, além de um importante papel na formação do medo, atribuiu-se à essa estrutura um tipo específico de memória chamada memória emocional, a qual, segundo LeDoux (1993), é uma categoria especial de memória que envolve aprendizado implícito (provavelmente não consciente) e armazenamento da informação sobre o significado do evento emocional. De modo que a investigação de áreas, particularmente envolvidas com a emoção do medo, como a substância cinzenta periaquedutal podem contribuir com os avanços sobre memória emocional. Além disso, a SCP em conjunto com a amígdala, fazem parte de um sistema cerebral aversivo (Carobrez, 1987), capaz de modular respostas de defesa à estimulação aversiva condicionada (Fanselow e cols., 1993).

Por outro lado o estudo das bases neurais da memória emocional, dependem de investigações criteriosas sobre o mecanismo modulatório que essas áreas exercem sobre a expressão comportamental.

O principal mecanismo que tenta explicar a base neural da memória, tem sido a potenciação de longo prazo (LTP, *Long Term Potentiation*), provavelmente o mais popular e em voga conceito de como a memória poderia estar sendo formada no sistema nervoso (Izquierdo & Medina, 1995; Martin e cols., 1997; Buchs & Muller, 1996; Murphy & Glanzman, 1997). O conceito de uma rede neuronal de trabalho foi o primeiro esquema que surgiu, inicialmente em 1884, por Exner (Hölscher, 1997). O princípio básico das redes neuronais é que conexões entre neurônios podem mudar em uma definida via uso-dependente e desta forma estocar informações.

O LTP, fenômeno de aumento da força sináptica obtido por fortes estimulações, foi verificado primeiramente no hipocampo (Lømo, 1966; Bliss e Lømo, 1973), uma estrutura conhecidamente envolvida nos processos de aprendizagem (Zola-Morgan e cols., 1986). A revolucionária descoberta mostrou que quando os neurônios eram estimulados em uma via definida, havia mudança na resposta sináptica.

Durante a transmissão sináptica normal de baixa frequência, o glutamato é liberado da terminação pré-sináptica, atuando tanto sobre os receptores NMDA como sobre os receptores não-NMDA (quisqualato/kainato), localizados próximos um do outro. O fluxo de sódio e potássio pelos receptores não-NMDA despolarizam a membrana pós-sináptica e deslocam o íon magnésio do canal NMDA, permitindo que os íons sódio, potássio e cálcio fluam pelo canal NMDA. O aumento da concentração de cálcio intracelular ativa proteínas quinases Ca^{++} /dependentes e induz o potencial de longo prazo (Beatty, 1995; Kandel e cols., 1997). Uma vez induzido o LTP, sugere-se que a célula pós-sináptica libere um mensageiro retrógrado que atuaria na terminação pré-sináptica atuando sobre quinases, o que intensificaria a liberação do transmissor (figura 3).

A plasticidade sináptica, uma capacidade dos neurônios em modular a força de suas conexões sinápticas em resposta às suas experiências celulares e ambientais, parece contribuir para uma variedade de processos no cérebro adulto, incluindo aprendizado, armazenamento de memória, perda de memória relacionada à idade, epilepsia, e tolerância e dependência de drogas de abuso (Bliss & Collinridge, 1993; Martin & Kandel, 1996; Nestler & Aghajanian, 1997).

O LTP tem sido extensivamente relacionado aos processos de memória e aprendizado, em parte porque não existem outros bons candidatos com esta atribuição (Johnston, 1997).

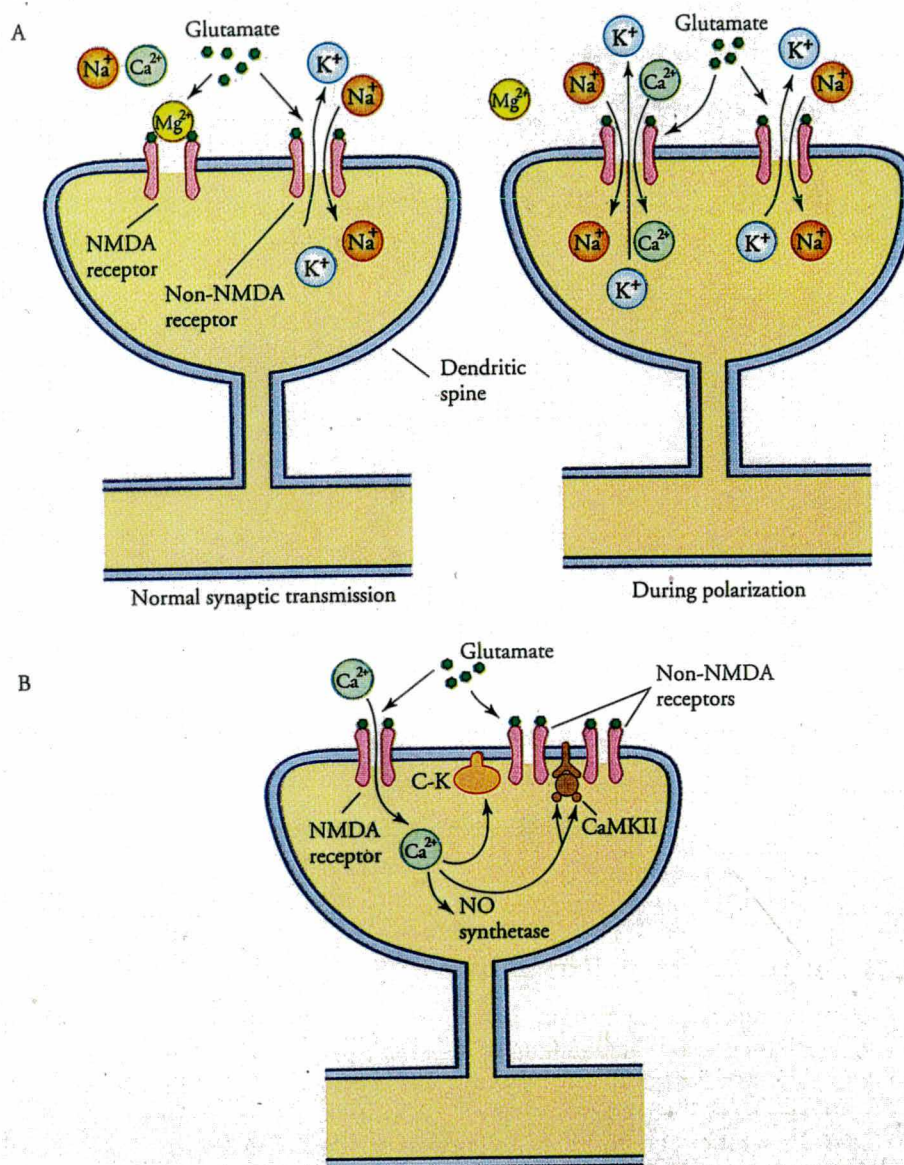


Figura 3: Hipótese dos eventos moleculares durante a potenciação de longo prazo. **(A)** Quando o neurônio pós-sináptico não está despolarizado, o receptor NMDA está bloqueado pelo magnésio. **(B)** A ligação do glutamato em receptores não-NMDA produz um EPSP normal. Quando a célula pós-sináptica é despolarizada por um estímulo fraco, o magnésio deixa de bloquear o receptor NMDA, resultando em um influxo de cálcio e sódio. **(C)** O cálcio ativa proteínas quinases dependentes de cálcio, resultando no LTP. Isto também desencadeia um mensageiro retrógrado, o óxido nítrico, que é captado pelo terminal pré-sináptico e aumenta a liberação do aminoácido excitatório glutamato. *Fonte:* Beatty (1995).

O início desses estudos foi estabelecido utilizando-se o molusco *Aplysia*, com inúmeros pesquisadores mostrando os circuitos envolvidos na aquisição de várias formas simples de aprendizado motor, habituação e sensitização de uma resposta de retração a um estímulo sensitivo e condicionamento clássico dessa resposta (Hawkins e Kandel, 1984). As sinapses em *Aplysia* exibem plasticidade sináptica de curto e longo prazo, as quais apresentam diferentes participações no comportamento. Estas sinapses sensorimotor trabalhadas neste molusco dependem do receptor NMDA e a eliminação de duas moléculas importantes para o LTP: receptores NMDA e proteína quinase dependente de Ca^{++} /calmodulina, bloqueiam o LTP e impedem o aprendizado no modelo do labirinto aquático de Morris (Johnston, 1997).

A plasticidade sináptica, fenômeno essencial para a memória, pode existir em ambas formas, de curta e de longa duração (Martin e cols., 1997). A plasticidade de curta duração requer somente modificações covalentes de proteínas pré-existentes, enquanto a plasticidade de longa duração requer alterações na expressão genética, síntese de novas proteínas e o estabelecimento de novas conexões sinápticas (Goelet e cols., 1986; Bailey e cols., 1996). Estudos recentes, tem mostrado que a memória de longa duração independe da memória de curta duração, sugerindo dessa forma que esses mecanismos possam também estar ocorrendo independentes (Izquierdo e cols., 1998)

Apesar do LTP ser considerado o melhor mecanismo para explicar o evento molecular da formação da memória, estes testes têm sido realizados *in situ* (Buchs & Muller, 1996; Martin e cols., 1997; Murphy & Glanzman, 1997), o que pode ser considerado como um modelo representativo não otimizado, tendo em vista outras vias e estruturas neurais que provavelmente participam neste processo. Assim, o

estudo *in vivo* (Izquierdo, 1994; Tsien e cols., 1996; Hölscher, 1997) continua sendo considerado o mais abrangente, apesar das dificuldades em se correlacionar o comportamento animal com o humano. Na realidade, o que tem sido observado é uma complementaridade entre os dois modelos de abordagem, *in situ* e *in vivo*.

Apesar das regras utilizadas por um rato para percorrer um labirinto serem bem diferentes das regras que utilizamos para desenvolver inúmeras atividades, as bases neurais para o processamento dessa função no rato é semelhante no humano (Izquierdo, 1988).

Vários testes em animais de laboratório têm mostrado esta representabilidade em humanos (Blanchard & Blanchard, 1988), algumas vezes de forma bem direta, como numa investigação clássica de condicionamento, o qual originalmente foi usado por Ivan Pavlov, como um procedimento experimental que envolve o pareamento de um estímulo inicial inócuo (estímulo neutro) com um segundo estímulo (estímulo incondicionado).

Esses experimentos de condicionamento da resposta do medo, utilizam ratos que foram treinados através de aparelho que utiliza como estímulo o som, a luz e o choque nas patas (Miserendino e cols., 1990; Parent e cols., 1994). Ao ouvir um som, ou perceber um "flash" de luz, o rato recebe choque nas patas, e após algumas repetições desta experiência o rato, ao ouvir o som ou perceber a luz, sem o recebimento do choque nas patas, desenvolve toda a resposta apresentada após o choque. O "flash" e o som são estímulos condicionados e o choque nas patas um estímulo incondicionado. A reação do rato foi uma resposta condicionada, embora este tipo de condicionamento ocorra mais rapidamente em ratos do que em humanos (Izquierdo, 1988).

O estudo das formas de medo: condicionado ou incondicionado tem proporcionado avanços importantes, principalmente porque além do rato ser um dos animais mais estudados em laboratório, o comportamento que este animal expressa em situações de medo pode prever um comportamento análogo para a emoção humana. Este fato tem sido argumentado desde Darwin (1872), que foi o pioneiro desta constatação, a seguir outros autores certificaram a relação entre as vias neurais envolvidas no comportamento animal e humano (Barnett, 1958; Leyhausen, 1979).

Partindo dessa premissa, nosso trabalho investigou a participação do receptor NMDA na SCPd de ratos, utilizando o modelo de labirinto em T elevado, recentemente desenvolvido (Graeff e cols, 1993), o qual permitiu medir, no mesmo animal, a esquiva inibitória aos braços abertos, representando o medo aprendido, e a fuga de um dos braços abertos, um comportamento aparentemente motivado por um medo típico da espécie a lugares abertos e/ou elevados.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Sabendo-se do envolvimento da substância cinzenta periaquedutal no sistema cerebral aversivo, e da participação de receptores NMDA no aprendizado, o presente trabalho teve o intuito de investigar a influência da manipulação do sistema glutamatérgico NMDA da SCPd, sobre a aquisição de uma resposta de esquia a um estímulo aversivo, evocado no modelo do labirinto em T elevado.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Pelo fato do modelo LTE ser composto de uma fase de aquisição da resposta de esquia, foram determinadas as seguintes etapas a serem cumpridas:

- Verificar o efeito da administração do antagonista NMDA, o AP-5, microinjetado anterior à aquisição da resposta de esquia;
- Investigar o efeito da administração do mesmo antagonista microinjetado imediatamente após à aquisição da resposta de esquia;
- Investigar o efeito da administração do antagonista NMDA, o AP-5, microinjetado anterior ao teste realizado 72 horas após à aquisição.
- Verificar a sensibilidade da medida de avaliação do risco sobre a ansiedade gerada no LTE.

MATERIAIS & MÉTODOS

III. MATERIAIS & MÉTODOS

1. ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos albinos *Wistar*, machos, com idade entre 60 e 75 dias, pesando entre 200 e 250 g. Após o desmame, os animais foram alojados em grupos compostos por oito animais, em caixas plásticas (15 x 36 x 30 cm) forradas com serragem, onde permaneceram até 2 meses de idade. Durante a realização dos experimentos os animais tiveram livre acesso a água e comida e após a cirurgia foram alojados em grupos de 2 em ambiente com temperatura ($23 \pm 1^\circ \text{C}$) e ciclo de luz controlados (12/12 claro/escuro).

2. DROGAS E SOLUÇÕES

Nos experimentos realizados foram utilizadas:

- A) Para aplicação IP como anestésicos: Tribromoetanol 2,5% (Aldrich, EUA) dissolvido em água destilada; pentobarbital sódico 5 % dissolvido em 30% etanol absoluto e 70 % propilenoglicol.
- B) Para aplicação intracerebral: líquido artificial (LA) constituído por NaCl (8,1 g), KCl (0,25 g), CaCl_2 (0,14 g), MgCl_2 (0,11 g) e Na_2CO_3 (1,0 g), dissolvidos em um litro de água destilada (Merlis, 1940); 2-Amino-5-fosfopentanoico (AP5; Sigma, EUA) nas concentrações de 3, 6 e 12 nmoles, dissolvidos em líquido artificial (LA).

3. CÂNULAS

As cânulas-guia, utilizadas para as microinjeções na substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd), foram confeccionadas no próprio laboratório a partir de agulhas estéreis e descartáveis 25 x 7 mm e então cortadas à um comprimento de 11 mm. Para impedir o entupimento da cânula por secreções foi introduzido, no momento de sua fixação na calota craniana, um mandril metálico, o qual foi removido apenas no momento da microinjeção.

4. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Para a realização da cirurgia de implante de cânula, os animais inicialmente foram anestesiados com tribromoetanol 2,5 % (1 ml/100 g, I.P.). Uma vez verificada a perda total dos reflexos, procedeu-se a tricotomia de toda a parte superior da cabeça. Em seguida o animal foi adaptado no aparelho estereotáxico (Stoelting, mod. 300, USA) e foi realizada antibioticoprofilaxia com 0,1 ml de pentabiótico veterinário por via intramuscular.

Posteriormente, procedeu-se a assepsia da área com álcool iodado e uma solução de lidocaína 2 % com adrenalina foi injetada subcutaneamente delineando o campo cirúrgico. Após o debridamento do tecido, expôs-se a calota craniana numa área que abrangeu as suturas lambdóide e bregma, as quais ficaram bem evidentes após a retirada dos tecidos adjacentes e secagem da área. O bregma e o lambda foram posicionados em um mesmo plano horizontal.

A perfuração da calota craniana foi realizada com broca odontológica para a fixação de dois parafusos (um no osso parietal esquerdo e outro no direito) e da cânula-guia. As cânulas-guias foram direcionadas à SCPd segundo as coordenadas:

AP= -7.6 mm, ML=1.9 mm e DV=2.0 mm, partindo-se do bregma e em ângulo de 22°, segundo Paxinos & Watson (1986).

Após procedimento de fixação dos parafusos, a área foi preenchida com uma prótese de polímero de acrílico para a sustentação da cânula. Decorridos alguns segundos para a total polimerização da prótese, o animal foi colocado em caixa individual aquecida, até o momento de despertar da anestesia. Posteriormente, os animais foram removidos para outra caixa em grupo de dois, onde permaneceram por sete dias para a recuperação da cirurgia.

5. MICROINJEÇÃO INTRACEREBRAL

Para a realização da microinjeção intracerebral, o animal foi imobilizado com auxílio de um pano e, com um alicate, cortado o mandril da cânula. Em seguida foi procedida uma cuidadosa limpeza de toda a extensão da cânula com uma lima odontológica nº 15, com o intuito de impedir o entupimento da agulha durante a microinjeção. Para a aplicação da droga, foram utilizadas agulhas odontológicas (0,3 mm de diâmetro) cuidadosamente cortadas com um comprimento de 14 mm. Esta agulha foi conectada a um tubo de polietileno de pequeno diâmetro, o qual foi adaptado a uma microseringa de 5 µl (Hamilton, USA). O tamanho das agulhas excederam em 3 mm aqueles que foram aplicadas nas cânulas, garantindo a aplicação do composto diretamente na SCPd, impedindo danos teciduais pela cânula. O volume microinjetado na SCPd foi monitorado com o auxílio de um tubo de polietileno aderido acoplado à microseringa, o qual foi previamente preenchido com água, em seguida com uma bolha de ar e então com a droga. A movimentação desta bolha de ar mostrou o volume injetado.

As condições das microinjeções na SCPd foram as seguintes:

- 1) *Injeção pré-aquisição*: cinco minutos antes das sessões de aquisição (primeira exposição do animal ao LTE).
- 2) *Injeção pós-aquisição*: injeção feita imediatamente após as sessões de aquisição.
- 3) *Injeção pré-teste*: 5 minutos antes do teste realizado 72 horas após às sessões de aquisição.

Em todas as etapas os animais controle receberam microinjeção de líquido artificial.

Os volumes utilizados para as injeções cerebrais (SCPd) foram de 0,3 μ l por sítio neural em 30 segundos; em seguida o animal foi cuidadosamente colocado na caixa de origem por 5 minutos e então submetido aos testes comportamentais.

6. LABIRINTO EM T ELEVADO (LTE)

Para a realização dos experimentos comportamentais, foi utilizado o modelo de labirinto em T elevado (LTE), proposto por Graeff e cols. (1993). Este modelo é uma adaptação do labirinto em cruz elevado (LCE), através da utilização de um anteparo que bloqueia a entrada de um dos braços fechados do LCE, de forma a obter um labirinto com dois braços abertos (50 x 10 cm) e um braço fechado (50 x 10 x 40 cm), com dimensões correspondentes ao LCE (50 x 10 x 40 cm) e elevado à 50 cm do chão. Os braços abertos são circundados por uma lâmina de acrílico de 1 cm de altura, para evitar a queda dos animais.

O aparelho utilizado no experimento estava localizado em uma sala isolada por paredes recobertas com lã de fibras de vidro, iluminada com luz branca com intensidade semelhante ao biotério de recuperação e sala de injeção, e com

temperatura ambiente controlada (23 ± 2 °C). Após testar cada animal, a limpeza do aparelho foi realizada com etanol 10%.

Os experimentos foram registrados por vídeo, o que possibilitou que o animal ficasse sozinho na sala, com as imagens sendo acompanhadas em outra sala por TV e gravadas em fitas de vídeo-cassete.

Todos os experimentos foram realizados entre às 13h e 18h.

7. PADRÕES COMPORTAMENTAIS: ESQUIVA INIBITÓRIA, FUGA E TENTATIVA

Utilizando este modelo de labirinto em T elevado (LTE), foram avaliados os padrões comportamentais de esquiva inibitória, fuga e tentativa de saída.

No teste de esquiva inibitória, o rato foi colocado no final do braço fechado e então determinou-se a latência da esquiva passiva (LEP), que consistiu no tempo que o animal levou para sair do braço fechado, com as quatro patas, para o braço aberto. Esta medida foi realizada em três sessões, obedecendo um intervalo de 30 segundos entre as sessões. O tempo máximo de exposição do animal em cada sessão de esquiva foi de 5 minutos.

Durante as sessões de esquiva também foi determinado o número de tentativas, definido como o número de vezes que o animal tentou sair do braço fechado para o braço aberto mas não efetivou a saída. Foi considerado considerada uma tentativa quando o animal posicionou-se com a cabeça, ou uma, duas ou três patas no braço aberto e retornou para o braço fechado.

Finalizada as 3 sessões de aquisição de esquiva inibitória, o animal foi retirado do labirinto, colocado na caixa de origem por mais 30 segundos e na sequência realizado a tarefa.

Para a tarefa de fuga, o animal foi colocado no final do braço aberto do LTE, e verificado o tempo necessário para o animal chegar com as quatro patas no centro do labirinto, medida denominada latência da fuga (LF). Esta determinação foi realizada em apenas uma sessão, sendo que o tempo máximo de exposição também foi de 5 minutos. Os animais que caíram do labirinto não foram descartados mas, no momento da queda, o cronômetro foi parado e acionado novamente apenas quando o animal foi recolocado no braço aberto.

Visando a otimização do modelo LTE, foi também determinado neste trabalho o comportamento exploratório através de uma medida, denominada *avaliação de risco*, tida como um índice do comportamento exploratório do animal, e determinado pelo número de tentativas dividido pela latência de esquiva da sessão, multiplicado por 1000. As comparações foram feitas pelos valores obtidos com o grupo controle.

Setenta e duas horas após as sessões de treino, o animal foi novamente submetido ao labirinto, para a obtenção das medidas de esquiva e fuga, ambas realizadas em apenas uma sessão cada, com intervalo de 30 segundos na caixa moradia.

8. HISTOLOGIA

Após o teste, os animais foram encaminhados para a perfusão do cérebro, realizada como segue: os animais foram anestesiados com solução de pentobarbital (0,3 ml / 100 g, I.P.) e, por incisão e abertura da caixa torácica, introduzia um

escalpe no ventrículo esquerdo acompanhado de uma incisão no átrio direito. A perfusão inicialmente foi feita com salina 0,9% e em seguida por formaldeído 10%. Em seguida, o animal foi decapitado e feita a marcação do local da microinjeção por solução de azul de Evans (0,3 µl). Após a marcação, os cérebros foram removidos e armazenados por quatro dias em formaldeído 10%. Os cérebros foram fatiados em micrótomo de congelamento (Cryocut 1800, USA). Os sítios das injeções foram identificados através da comparação do corte com os diagramas do atlas do cérebro de ratos de Paxinos & Watson (1986).

9. ESTATÍSTICA

Para o análise das respostas obtidas com as medidas de esquiva inibitória e avaliação do risco no protocolo experimental de injeção pré aquisição, os dados foram submetidos ao teste de variância (ANOVA), seguido da análise de covariância (ANCOVA) para a qual foram consideradas como variável dependente a sessão 3 e covariada a sessão 4 e como medida independente o tratamento.

Nos demais protocolos de injeção (pós-aquisição e pré-teste), para as mesmas medidas, foi utilizado o teste de covariância (ANCOVA) onde a variável dependente foi a sessão 4 e as covariáveis foram as sessões, 1, 2 e 3 e o tratamento foi considerado como variável independente, seguido do teste *post hoc* LSD.

Todos os dados foram expressos como média \pm EPM.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. LOCALIZAÇÃO HISTOLÓGICA

O monitoramento histológico mostrou que a inserção da cânula foi procedida na porção dorsal da substância cinzenta periaquedutal. A variação no eixo rostro-caudal foi limitada entre bregma -7,61 a -6,50 mm, mostradas esquematicamente pelas secções frontais do atlas de Swanson (1992) na figura 4.

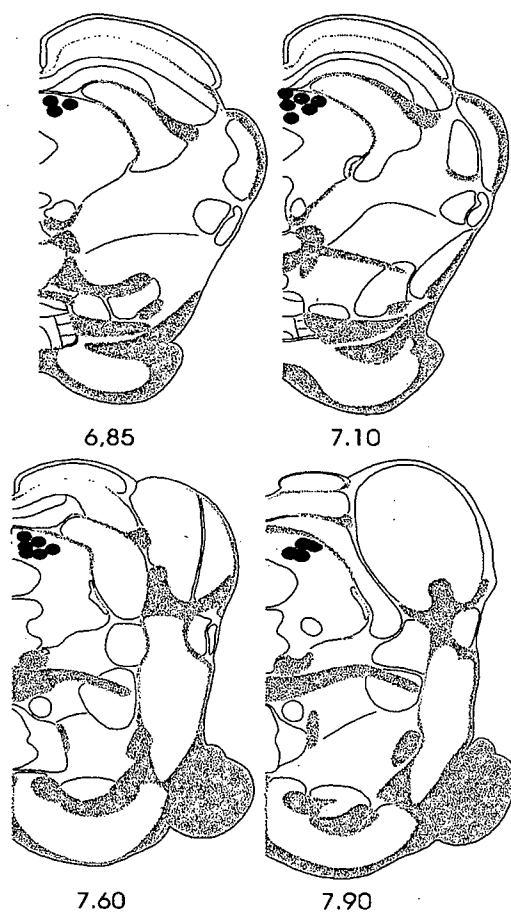


Figura 4: Secções frontais do atlas de Swanson (1992), indicando os sítios de microinjeções de compostos na SCPd. O número de marcações são inferiores aos animais utilizados devido a sobreposições de sítios.

2. EFEITO DA INJEÇÃO DE AP-5 INJETADO PREVIAMENTE À AQUISIÇÃO DA ESQUIVA INIBITÓRIA

Os resultados obtidos com a microinjeção de AP-5, nos padrões de esQUIVA inibitória e na avaliação do risco estão mostradas nas figuras 5A e 5B, respectivamente.

Na esQUIVA inibitória a análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas, revelou uma diferença significativa entre os tratamentos [$F(3,36)=3,1$; $p<0,05$], entre as sessões de esQUIVA [$F(3,108)=28,4$; $p<0,0001$] e na interação entre tratamento e esQUIVA [$F(9,108)=4,3$ $p<0,0001$].

O AP-5 nas doses de 6 e 12 nmol, prejudicou a aquisição da esQUIVA inibitória dos braços abertos do labirinto em T elevado, sugerindo um prejuízo no aprendizado desse comportamento. Além disso, sugere-se também um efeito ansiolítico do AP-5 na dose de 12 nmol, visto que os animais que receberam este tratamento ficaram menos tempo no lado fechado do labirinto, quando comparados com o grupo controle que recebeu líquor.

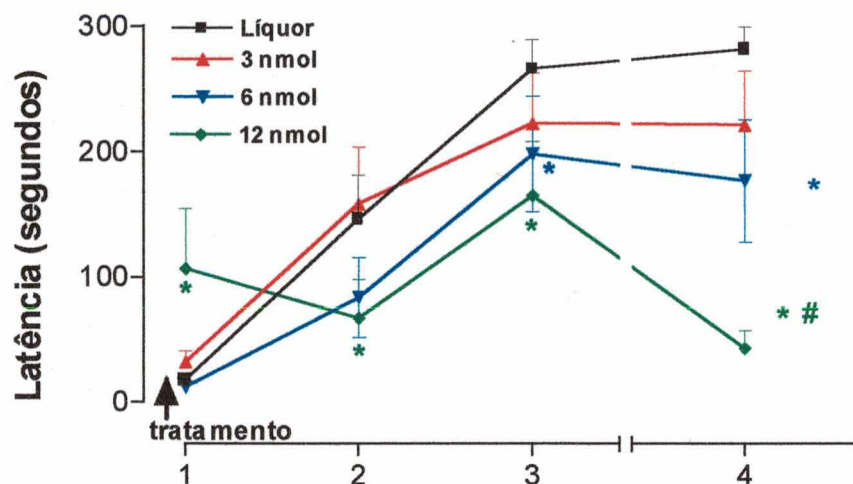
No teste realizado 72 horas após, o teste de covariância (ANCOVA) [$F(3,35) = 0,13$; $p= 0,9$] não mostrou diferença estatística, sugerindo dessa maneira, que as alterações verificadas na sessão 4 foram dependentes dos efeitos do tratamento observados na sessão 3. Desta maneira conclui-se que o tratamento nas doses de 6 e 12 nmol, alterou a resposta verificada três dias após. Indicando uma grande influência da aprendizagem e/ou ansiedade sobre a evocação comportamental.

O efeito ansiolítico, ficou também evidenciado na análise da avaliação do risco (figura 5B). Nesta figura a ANOVA mostrou diferença significativa no decorrer das sessões [$F(3,108)=5,81$; $p<0,05$] e também na interação destas sessões com o tratamento [$F(9,108)=6,57$; $p<0,00001$]. Análise posterior mostrou que em todas as

doses utilizadas o AP-5 reduziu os valores da avaliação do risco na sessão 1. Uma ressalva importante, contudo pode ser detectada com os animais que receberam a dose de 12 nmol, onde os valores de avaliação de risco reduzidas na sessão 1 ocorre concomitantemente a valor da latência de esquiva aumentada (figura 5A e figura 5B), sugerindo efeito sedativo do AP-5. Contudo no experimento realizado três dias após o aprendizado (figura 5B), a análise de covariância (ANCOVA) [$F(3,35) = 0,9$; $p = 0,43$] mostrou que não houve diferença estatística, sugerindo que da mesma forma que a latência de esquiva, as alterações evidenciadas na sessão 4 foram dependentes da resposta verificada na sessão 3.

No comportamento de fuga (figura 6) que foi realizado trinta segundos após as sessões de esquiva, o teste ANOVA, $F(3,36) = 3,73$ ($p < 0,05$) mostrou um prejuízo do desempenho dos ratos que receberam tratamento com o AP-5 na dose de 12 nmol, sugerindo efeito ansiolítico neste padrão comportamental. Porém, em virtude da resposta obtida com esta dose de 12 nmol na de esquiva inibitória, pode-se também sugerir um possível efeito sedativo.

A



B

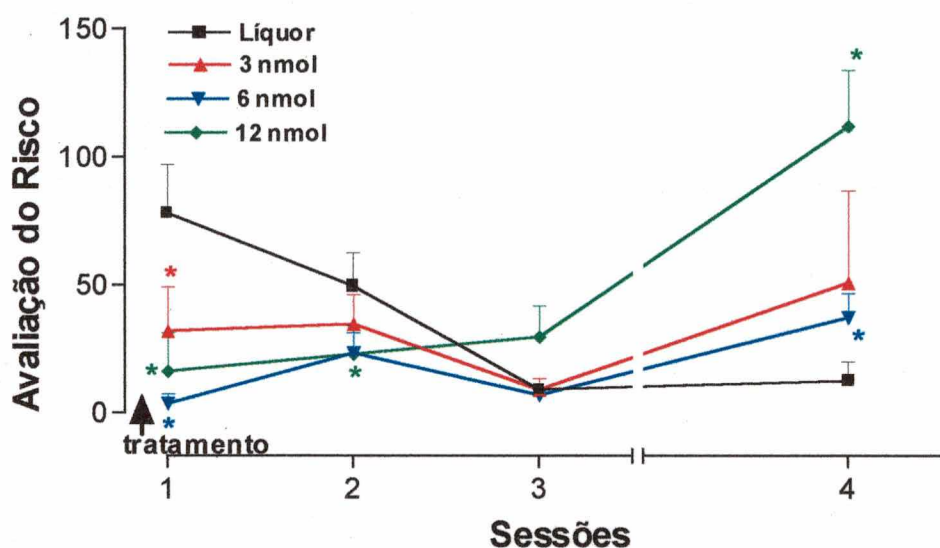


Figura 5: Efeito do AP-5 microinjetado ($0,3 \mu\text{l}$) na SCPd de ratos 5 min antes da exposição ao labirinto em T-elevado (LTE). As sessões 1, 2 e 3 foram realizadas no mesmo dia enquanto a sessão 4 foi realizada 72 horas após. Os resultados representados no gráfico, referem-se a média \pm epm. **A=** Curva de aquisição de esquiiva inibitória no LTE; **B=** Curvas de avaliação do risco no LTE. Nomenclatura estatística: *= diferença significativa entre animais tratados com líquido e AP-5; # = diferença significativa entre sessão 3 e 4.

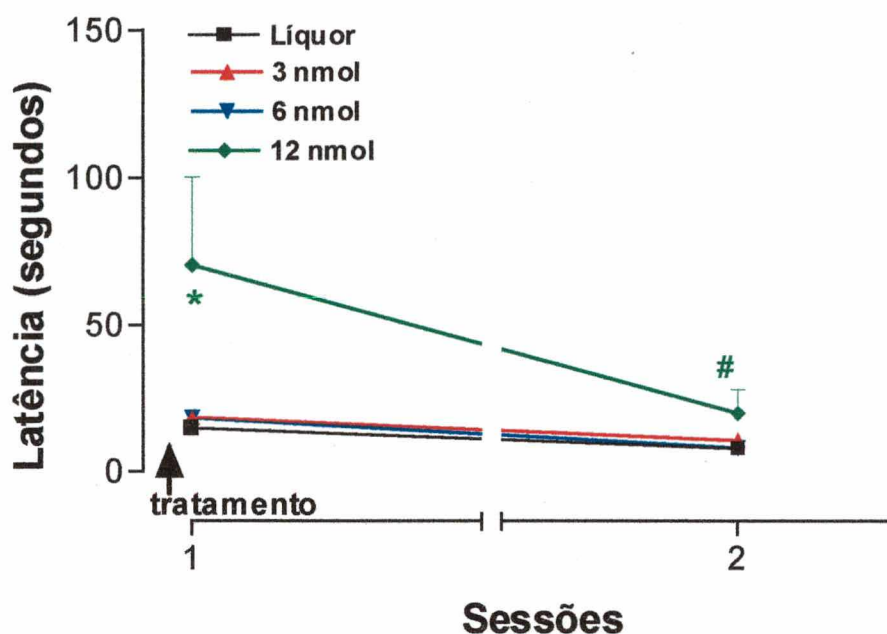


Figura 6: Efeito do AP-5 microinjetado ($0,3 \mu\text{l}$) na SCPd de ratos 5 min antes da exposição ao labirinto em T-elevado (LTE). Os resultados representados no gráfico, referem-se a média \pm epm. A curva se refere à fuga aos braços abertos do LTE. Nomenclatura estatística: * = diferença significativa entre animais tratados com líquido e AP-5; # = diferença significativa entre sessão 3 e 4.

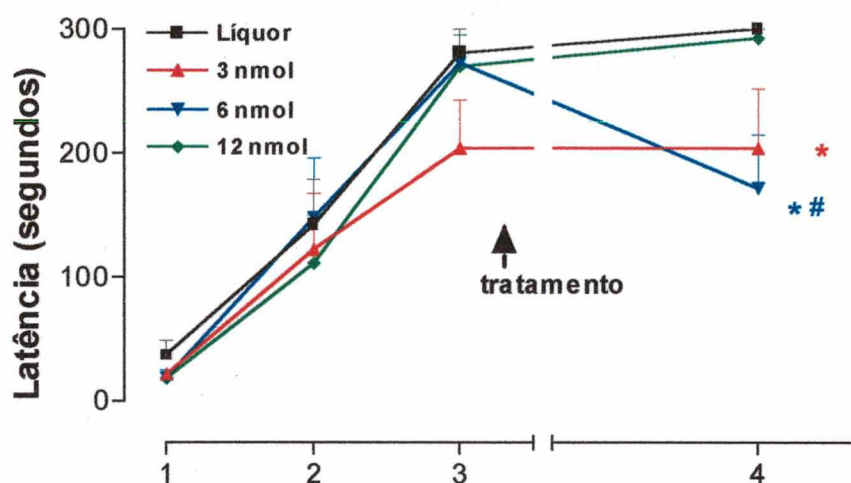
3. EFEITO DA INJEÇÃO DE AP-5 MICROINJETADO POSTERIORMENTE ÀS SESSÕES DE AQUISIÇÃO DA ESQUIVA INIBITÓRIA

Os resultados referentes ao efeito do AP-5 microinjetado imediatamente após à sessão 3 sobre a sessão 4 nos animais submetidos ao LTE encontram-se representados nas figuras 7A e 7B.

Os dados da esQUIVA inibitória foram submetidos a análise de covariância (ANCOVA) onde a variável dependente foi a sessão 4 e as covariáveis foram as sessões, 1, 2 e 3. Todos os grupos mostraram uma curva característica de aquisição de esQUIVA inibitória (Figura 7A).

A ANCOVA revelou uma diferença significativa entre os tratamentos [$F(3,40)=3,14$ $p<0,05$]. O teste *post hoc* (LSD), comparando-se as sessões 3 e 4, revelou um efeito do AP-5 somente na dose de 6 nmol.

A



B

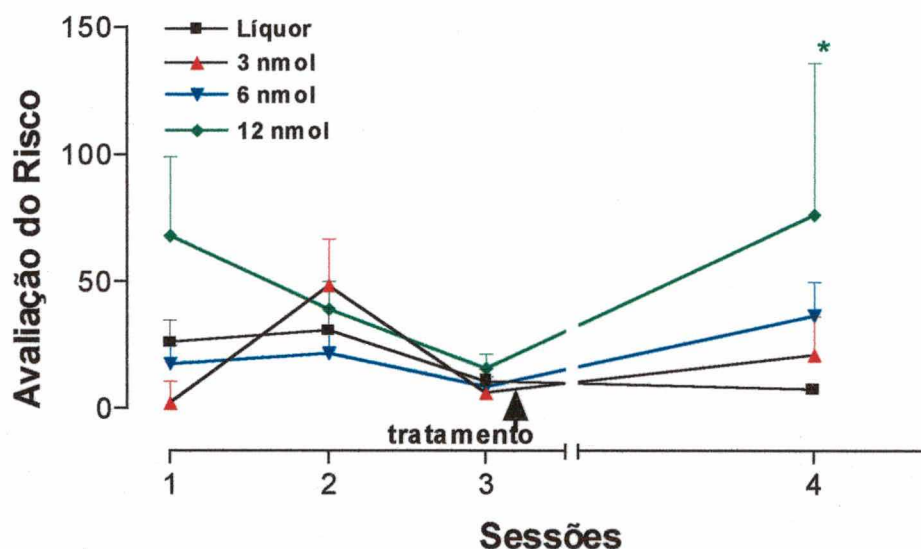


Figura 7: Efeito do AP-5 microinjetado (0,3 μ l) na SCPd de ratos imediatamente após à exposição ao labirinto em T-elevado (LTE). As sessões 1, 2 e 3 foram realizada no mesmo dia enquanto a sessão 4 foi realizada 72 horas após. Os resultados representados no gráfico, referem-se a média \pm epm. **A=** Curva de aquisição de esquiva inibitória no LTE; **B=** Curvas de avaliação do risco no LTE. Nomenclatura estatística: *= diferença significativa entre animais tratados com líquido e AP-5; # = diferença significativa entre sessão 3 e 4.

Por outro lado a ANCOVA realizada com os dados da avaliação de risco (Figura 7B), mostrou tendência de efeito para os tratamentos [$F(3,129)=2,23$ $p<0,07$]. O teste LSD comparando-se os dados das sessões 3 e 4 revelou um aumento na avaliação de risco nos animais tratados com a dose de 12 nmol de AP-5.

A respeito do comportamento de fuga (Figura 8), não houve nenhuma diferença entre as doses de AP-5 administradas imediatamente após as sessões de aquisição. Mostrando que o tratamento não interfere com a resposta de fuga, obtida após 72 horas.

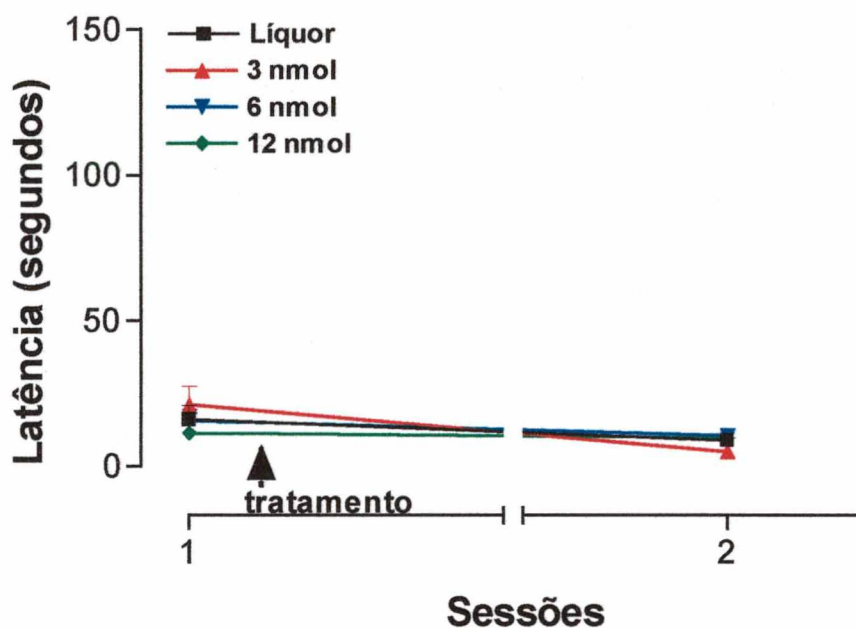


Figura 8: Efeito do AP-5 microinjetado ($0,3 \mu\text{l}$) na SCPd de ratos imediatamente após à exposição ao labirinto em T-elevado (LTE). Os resultados representados no gráfico, referem-se a média \pm epm. A curva se refere à fuga aos braços abertos do LTE.

4. EFEITO DO AP-5 INJETADO PREVIAMENTE AO TESTE

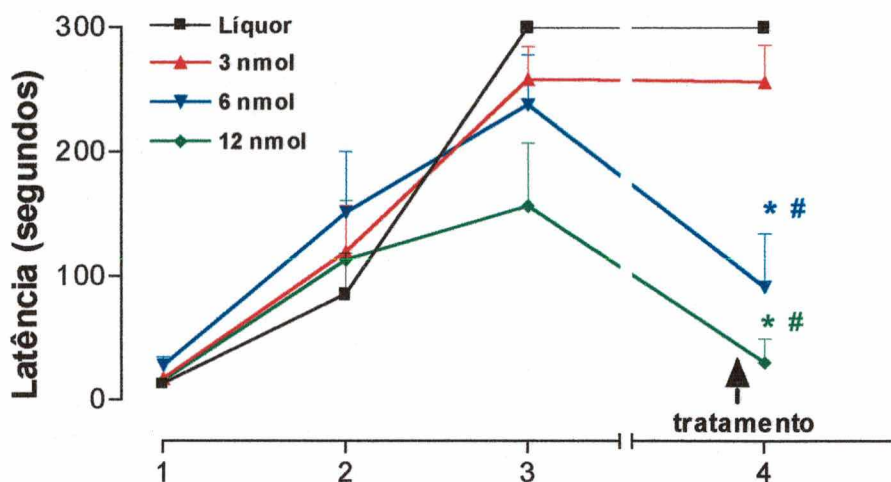
Os dados obtidos pelo tratamento com AP-5, injetado 5 minutos antes do teste (realizado 72 horas após a sessão 3) foi submetido a análise de covariância (ANCOVA) onde, a variável dependente foi a sessão 4 [$F,26$] = 13,3; $p < 0,00001$].

Além disso, o teste LSD mostrou diferença nas doses de 6 e 12 nmol representados por uma diminuição dependente da dose, na latência de esquia aos braços abertos, indicando que, o bloqueio do receptor NMDA pelo AP-5, inibiu a evocação do comportamento aprendido. Contudo, uma ressalva importante foi o resultado obtido com a injeção pré-aquisição, que se mostrou com um perfil semelhante ao verificado na injeção pré-teste (inibição da esquia inibitória com as doses de 6 e 12 nmol). Isto reforça a idéia que o AP-5 tenha efeito ansiolítico nessas doses, além de mostrar que o aprendizado não interferiu com a inibição da esquia, em teste realizado 72 após.

Na figura 9B, estão representados os dados da avaliação do risco. Apesar da ANCOVA não mostrar diferença significativa para os tratamentos, o teste *post-hoc* (LSD) mostrou que a dose 12 nmol na sessão 4 encontra-se aumentada em relação ao controle.

Por outro lado, os resultados obtidos com o teste de fuga (figura 10) com microinjeção de AP-5 realizada antes do teste, foram semelhantes aos obtidos com as microinjeções realizadas após a aquisição, indicando não haver diferença entre os tratamentos ou entre as sessões. Porém, salientando a ausência do efeito sedativo na dose de 12 nmol, este pode sugerir que o efeito sedativo verificado na figura 6 possa ser ansiolítico.

A



B

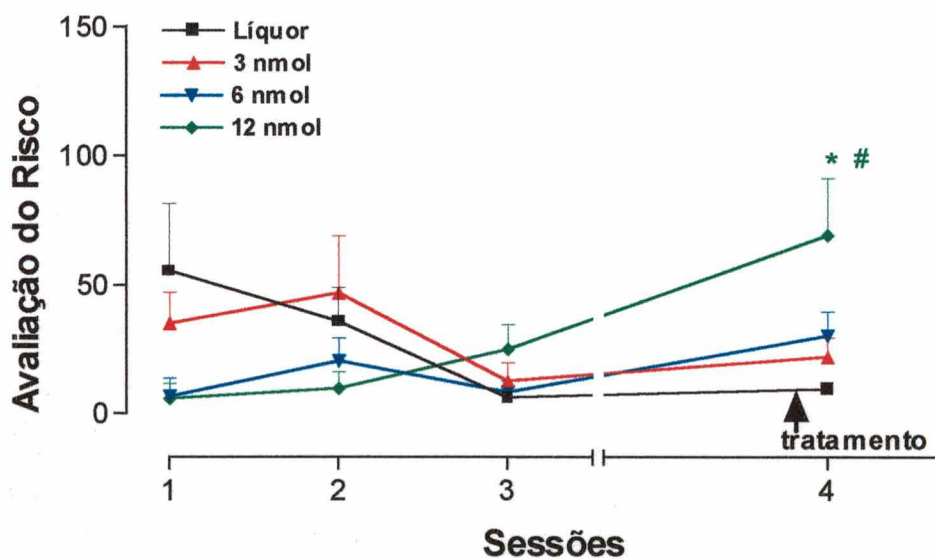


Figura 9: Efeito do AP-5 microinjetado (0,3 μ l) na SCPd de ratos 5 min antes ao teste, realizado 72 horas após à exposição ao labirinto em T-elevado (LTE). As sessões 1, 2 e 3 foram realizada no mesmo dia enquanto a sessão 4 foi realizada 72 horas após. Os resultados representados no gráfico, referem-se a média \pm epm. **A=** Curva de aquisição de esquia inibitória no LTE; **B=** Curvas de avaliação do risco no LTE. Nomenclatura estatística: * = diferença significativa entre animais tratados com líquor e AP-5; # = diferença significativa entre sessão 3 e 4.

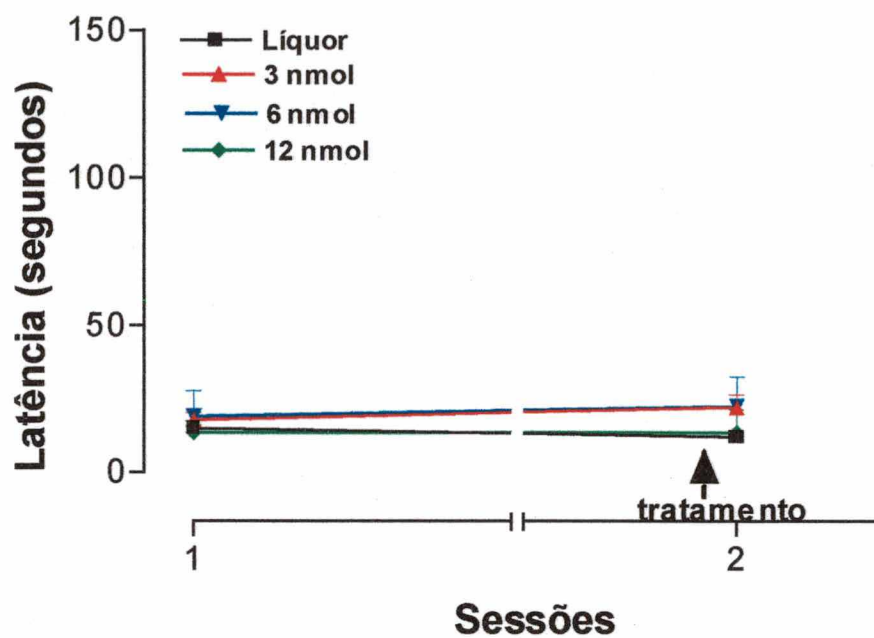


Figura 10: Efeito do AP-5 microinjetado (0,3 μ l) na SCPd de ratos 5 min antes ao teste, realizado 72 horas após à exposição ao labirinto em T-elevado (LTE). Os resultados representados no gráfico, referem-se a média \pm epm. A curva se refere à fuga aos braços abertos do LTE.

DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

O teste do labirinto em T elevado (LTE), um modelo utilizado para ansiedade e memória (Zangrossi e cols., 1997), pode ser caracterizado pelo medo do rato de permanecer nos braços abertos. Segundo Treit e cols. (1993), ratos não tratados, normalmente se esquivam dos braços abertos do labirinto em cruz elevado, preferindo permanecer no lado fechado, enquanto que ratos tratados com drogas ansiolíticas mostram uma diminuição da esquia aos braços abertos. Este fato, tem considerado os labirintos como um estímulo ansiogênico. O rato adquire informações sensoriais sobre o lugar de onde está através da tigmotaxia, de modo que a ausência das paredes laterais do braço aberto do labirinto, sinaliza ao rato um lugar inseguro, gerando um comportamento aversivo, verificado pela preferência do rato no lado fechado do labirinto. Conforme descrito na introdução, resultados obtidos por Shemberg & Graeff (1978), mostraram a relação do comportamento de defesa com ansiedade.

Além disso, a ansiedade é um comportamento que está relacionado a outras capacidades mentais como a memória, e esta relação intrínseca foi verificada neste trabalho, através da medida da latência de esquia.

Esta medida, possibilita a avaliação da capacidade de aquisição da esquia inibitória, comportamento verificado através de três exposições consecutivas do rato ao LTE. Uma quarta exposição deste animal, realizada 72 horas após, representa a capacidade do rato evocar o comportamento de esquia, fenômeno

que pode ser mantido por até quatro meses (Sanson & Carobrez, 1999). Este fato estimulou, inicialmente, a utilização deste modelo como alternativo para a investigação do efeito do AP-5, um antagonista do receptor NMDA, sobre a memória e aversão.

Trabalhos anteriores demonstraram a participação do glutamato tanto na ansiedade (Guimarães e cols., 1991) quanto na memória (Izquierdo & Medina, 1995; Mondadori & Weiskrantz). O envolvimento do receptor NMDA na memória, tem sido mostrado na fase de consolidação da memória e principalmente, nas memórias de longa duração. A administração de bloqueadores dos receptor NMDA causa amnésia em uma variedade de testes com ratos (Walker & Gold, 1991). Microinjeção intracerebral de aminoácido excitatório tem sido intensivamente usado como ferramenta para identificar grupos de comandos neuronais na reação de defesa tanto em ratos como também em gatos (Bandler, 1984). Partindo dessa premissa, sugere-se que o receptor NMDA seja intensamente estimulado quando o rato é submetido ao LTE. Assim, a latência de esquiva inibitória foi inibida pelo antagonista desse receptor, sugerindo um efeito ansiolítico do AP-5, além disso, esta inibição também sugeriu uma diminuição da capacidade de aprendizagem dos ratos.

Estudos sobre memória e ansiedade no mesmo rato, não tem sido muito explorada, em virtude do campo ainda obscuro da neurobiologia comportamental. Porém, LeDoux (1993) e LeDoux & Muller (1997), tem feito considerações importantes sobre o papel de regiões cerebrais na memória emocional, mostrando a interação entre memória e ansiedade.

No presente trabalho a latência de esquiva inibitória foi diminuída com o tratamento, sugerindo um efeito ansiolítico com as doses de 6 e 12 nmol de AP-5. Além da esquiva inibitória, a fuga parece também expressar um tipo de medo, visto

que o animal se encontra no lado aberto do labirinto, assim, como pode ser observado nas figuras 5 - 9, o tratamento com AP-5, mostrou efeito ansiolítico na dose de 12 nmol. Uma ressalva sobre o efeito do AP-5 na fuga, é a resposta obtida com o tratamento pré- teste onde a dose de 12 nmol não afetou a latência de fuga.

Este aparente paradoxo sugere que o LTE induziu um comportamento diferenciado de aversão e confirma os resultados obtidos por Treit e cols., (1993), que mostrou resposta comportamental diferente em ratos confinados ou não no braço aberto. Além disso, este resultado também está coerente com o fato de poucas drogas serem capazes de afetar o comportamento de fuga (Graeff e cols., 1998).

Por sua vez, a avaliação do risco, somado aos índices clássicos, fortaleceu a sugestão de efeito ansiolítico do AP-5 no LTE. Estes resultados são reforçados por trabalhos prévios, os quais mostraram que a inclusão de medidas de avaliação do risco proporcionam maior sensibilidade ao efeito ansiolítico tanto no LTE (Sanson & Carobrez, 1999) quanto no LCE (Rodgers & Dalvi, 1997). A avaliação do risco caracterizada pelo número de tentativa de saída para o lado aberto, apresenta como padrão uma curva decrescente no decorrer das sessões, uma relação inversamente proporcional á latência de esquia. Na figura 5B, o tratamento reduziu a avaliação do risco em todas as doses do AP-5, sugerindo que esta medida possa ser interpretada como complementar e reforçadora da ansiólise verificada com a esquia inibitória.

Em relação à neurotransmissão envolvida na ansiedade, Bandler (1982) demonstrou que o glutamato injetado em sítios da região mesencefálica foi capaz de evocar respostas somáticas e autonômicas na reação de defesa. Graeff e cols. (1988), confirmaram a mediação fisiológica por aminoácidos excitatórios endógenos

(glutamato) nos mecanismos de reação de defesa presentes na SCPd ou no hipotálamo medial (Carobrez, 1987).

Os dados autoradiográficos na SCPd mostraram inicialmente a existência de alta densidade de receptores para o glutamato, subtipo NMDA (Monaghan e Cotman, 1982; Clemens e cols., 1987; Albin e cols., 1990). Em adição, Beart e cols. (1988) mostraram que a comunicação entre o hipotálamo medial e a SCPd era mediada por aminoácidos excitatórios.

Ademais, o fato do antagonismo do receptor NMDA na SCPd também estar implicado em outros processos farmacológicos relacionados à comportamentos de defesa (Beart e cols., 1988), sustenta o resultado verificado no presente trabalho, de que o AP-5 teve efeito ansiolítico de maneira dependente da dose.

Frente às evidências discutidas acima, os resultados do presente trabalho sugerem que há uma participação importante do receptor NMDA na ansiedade e na memória analisados no LTE, além disso há uma provável participação de outras áreas cerebrais que possam dar suporte para a sugestão sobre o efeito mnemônico além do efeito ansiolítico. Além disso, a grande interação que parece existir entre memória e ansiedade, fortalece a idéia de LeDoux e cols. (1993) em se estudar a memória emocional.

Além das funções comportamentais conhecidas que incluem emoções relacionadas ao medo e à ansiedade, também tem sido mostrada a importância do receptor NMDA nos processos mnemônicos (Lee e cols., 1993; Mondadori & Weiskrantz, 1993; Izquierdo, 1994; Behbehani, 1995; Izquierdo & Medina, 1995; Gewirtz & Davis, 1997; Murphy & Glanzman, 1997; Martin e cols., 1997).

O antagonismo deste receptor pelo AP-5 prejudicou a memória no labirinto aquático (Morris e cols., 1986), no labirinto radial e no teste "step down"

(Mondadori e cols., 1988), e o efeito amnésico do AP-5 foi verificado em estruturas cerebrais como amígdala, córtex entorrinal, córtex parietal e hipocampo (Zanatta e cols., 1996). Entretanto, até o momento não tem sido investigado o efeito do AP-5 microinjetado na SCPd sobre os processos de aquisição e/ou consolidação da memória.

Kim e cols. (1991 e 1993) mostraram que o AP-5 injetado na SCP interfere com a aquisição e não com a expressão do medo condicionado, representado pelo *freezing*. No entanto, no presente trabalho foi verificado que o AP-5 foi capaz de interferir com ambos, no LTE (figuras 5A e 9A).

Por outro lado, o fato do número de exposições ter sido pré-estabelecido neste modelo dificultou a verificação de um critério de aprendizagem final, ou seja como foi fixado apenas três sessões de esquiva para verificação de aprendizagem, não se pode saber se o animal aprenderia se tivessem mais sessões.

Assim, o efeito do AP-5 verificado no presente trabalho sugere um prejuízo na aquisição do comportamento de esquiva inibitória, visto que este modelo já foi farmacologicamente testado e validado para ansiedade (Graeff & Zangrossi, 1997), trabalho recente demonstrou também efeito sobre a memória (De Mello, 1999). No entanto, se o efeito foi cognitivo ou emocional permanece desconhecido.

Os resultados obtidos com o tratamento feito imediatamente após à aquisição (figura 7A), etapa em que sugere-se estar ocorrendo a consolidação da memória, o AP-5 prejudicou a evocação do comportamento aprendido nas doses de 3 nmol e 6 nmol, mostrando que o tratamento interferiu com o processo de consolidação. Quanto à dose de 12 nmol o grupo foi considerado atípico, visto que não foi diferente do grupo controle. A consolidação da memória, que compreende a etapa entre a aquisição e evocação (Izquierdo, 1988; Born, 1999) tem sido a mais

susceptível a manipulações farmacológicas (McGaugh, 1966 e 1988), porém no presente trabalho o AP-5 mostrou interferir com maior intensidade quando injetado anteriormente à aquisição (figuras 5A e 5B) e ao teste (figuras 9A e 9B).

Visto que a consolidação está relacionada com o processo de fortalecimento dos “traços” de memória (Hebb, 1949; Gold & Delanoy, 1981), o fato do AP-5 provocar um prejuízo quando injetado imediatamente após à aquisição, sugere a participação de receptores NMDA nesta etapa de memória, o que confirma trabalhos anteriores que mostraram uma maior susceptibilidade desta fase de consolidação à manipulações farmacológicas (Izquierdo, 1988). Além disso, lembrando que a injeção do AP-5 foi na região dorsal da SCP, esta região parece também participar da consolidação da memória a eventos aversivos.

Uma outra etapa da memória, conhecida como evocação também é medida no modelo do LTE, pela latência de esquivas, no teste realizado 72 horas após à aquisição. Os resultados obtidos com a injeção de AP-5, mostrou-se efetivo em inibir a evocação comportamental, o que também está de acordo com trabalho de Spear & Mueller (1984) sobre alteração da evocação por manipulações farmacológicas.

Por outro lado, o prejuízo na evocação do comportamento aprendido, verificado com o AP-5 injetado previamente ao teste, pode estar interferindo com a memória do evento aversivo, da mesma maneira que também pode estar mascarado pelo efeito ansiolítico, ou somados a esse, já que o teste foi realizado na presença da droga.

Estes resultados são particularmente interessantes, uma vez que o prejuízo da memória foi verificado ser dependente do efeito ansiolítico (Viana e cols., 1994), e não parece ser um fator dependente do insucesso da aquisição, já que

animais que obtiveram o máximo de aquisição de esquiva inibitória, também mostraram um valor de latência reduzida, indicando um prejuízo na evocação quando a injeção de AP-5 foi feita antes do teste.

Destarte, se o AP-5 injetado na SCPd tem efeito sobre a memória emocional [visto que Handley (1991) e Viana e cols. (1994) documentaram sobre o interrelacionamento da ansiedade e memória]. No entanto, até que ponto os efeitos são somente ansiolíticos ou amnésicos, ou ainda se esses são sinérgicos, são questões que ainda precisam ser melhor investigadas.

Além disso, outro fato que poderia contribuir para o efeito observado do AP-5, é o fato de que a amígdala está intimamente relacionada com a SCPd e estímulos nociceptivos ou gerados em condições de perigo espécie-específico, poderiam dar início a processos na SCPd que induziriam uma resposta condicionada e/ou não condicionada (LeDoux & Muller, 1997).

Como o condicionamento é uma tarefa que envolve aquisição (Kim e cols., 1993), os dados obtidos no presente trabalho sugerem um envolvimento da SCPd na aquisição do medo condicionado verificado no LTE.

Além disso, uma vez que a SCPd recebe projeções da amígdala, além de programar as manifestações comportamentais (LeDoux & Muller, 1997), hormonais e neurovegetativas das reações de defesa (Graeff, 1991), é possível que esta estrutura participe também de alguma forma no aprendizado, através de aferências glutamatérgicas da amígdala, como sugerido pelo prejuízo na aquisição da esquiva inibitória e pelo efeito ansiolítico verificados através do antagonismo pelo AP-5.

Com efeito, tal inibição dos receptores NMDA pode estar interferindo na expressão do medo de duas maneiras: na resposta do medo e/ou no medo emocional.

O evento celular mais comumente citado para explicar o mecanismo da memória é a formação do potencial de longo prazo (LTP), o qual requer atividade do receptor NMDA em conjunto com receptores não-NMDA (Mondadori e cols., 1988; Kim & cols., 1991; Izquierdo & Medina, 1995; Beaty, 1995; Höischer e cols., 1997). Porém, aspectos moleculares relacionados à esse trabalho ainda precisam ser investigados, visto que foi verificado apenas o perfil farmacológico-comportamental.

Avanços importantes no estudo da memória, tem se conseguido com a biologia molecular. Trabalhos tem documentado que, além do fortalecimento sináptico mostrado pelo LTP, há também a participação de proteínas específicas para uma memória de longa duração ou de curta duração (Martin e cols., 1997). Dados comportamentais somados aos moleculares poderiam esclarecer em muitos aspectos o quê realmente ocorre no cérebro durante a expressão de comportamentos e a memorização

Porém, estas hipóteses requerem estudos mais aprofundados nos aspectos neurobiológicos dos comportamentos possivelmente relacionados: ansiedade e memória.

CONCLUSÕES

VI. CONCLUSÕES

Este trabalho mostrou que receptores NMDA do glutamato, presentes na SCPd, de ratos tem participação nos processos de ansiedade. Assim, o AP-5 apresentou efeito ansiolítico nas doses de 6 e 12 nmol, quando injetado na SCPd de ratos

Somado aos índices clássicos a medida da avaliação do risco, mostrou eficácia para determinar o efeito ansiolítico. Estes resultados mostraram uma proporcionalidade inversa sobre o efeito ansiolítico verificados com as medidas de latência de esquiva.

A memória emocional avalia em maiores amplitudes a memória com comportamentos que estão intimamente relacionados como a ansiedade. No entanto, há a necessidade de padronização e adaptações ao modelo LTE, para que esse possa ser realmente representativo na avaliação da memória emocional. Além disso, são necessários testes complementares em modelos mais específicos, afim de se investigar mais criteriosamente o papel da SCPd na memória.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Visto que questionamentos surgiram no decorrer destes ensaios, seguem algumas sugestões para trabalhos futuros que acreditamos ser pertinentes:

- Estudos sobre a participação da SCPd no efeito emocional (anulação ou suplantação do medo) e no efeito cognitivo, com posterior integração destes efeitos sobre a ansiedade e sobre a memória;
- Ensaios *in situ* que investiguem a possível existência do LTP na SCPd e a participação do receptor NMDA, bem como o possível envolvimento de outros receptores do glutamato, sobre a formação deste potencial.
- Estudos de biologia molecular com o objetivo de relacionar efeitos moleculares com os comportamentais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBIN, R. L.; MAKOWIEC, R.L.; HOLLINGSWORTH, Z.; DURE IV, L. S.; PENNEY, J. B.; YOUNG, A.B. Excitatory amino acid binding sites in the periaqueductal gray of the rat. *Neurosci. Lett.* **118**, 112-115, 1990.
- AMARAL, D. G. *Memory: anatomical organization of candidate brain regions*. in Handbook of Physiology : The Nervous System. Vol.5 (part 1) V.B. Mountcastle, F. Plum, S.r. Gerges (Eds), Bethesda : American Physiol. Soc., 1987.
- BALLENGER, J.C. Historical and modern concepts of anxiety: a focus on adrenergic function. In : Biology of Agoraphobia. Washington: APA Press. 1984.
- BANDLER, R. Introduction of 'rage' following microinjections of glutamate into midbrain but not hypothalamus of cats. *Neuroscience Lett* **30**, 183-188, 1982.
- BANDLER, R. *Identification of hypothalamic and midbrain periaqueductal grey neurones mediating aggressive and defensive behaviour by intracerebral microinjections of excitatory aminoacids*. In Bandler, R. (ed.), Modulation of sensorimotor activity during alterations in behavioral states, Liss, New York, 369-391, 1984.

BANDLER, R., CARRIVE, P.; DEPAULIS, A. The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical, and neurochemical organization. New York: Plenum.1991. 1 Introduction: emerging principles of organization of midbrain periaqueductal gray matter.

BARNETT, S.A. Social behaviour in wild rats. *Proc Zool Soc London* **130**, 107-152, 1958.

BATISTA-DA-SILVA, A.P., RAE, G.A.; CAROBREZ, A.P. Microinjection of D-2-amino-7-phosphonoheptanoate into the periaqueductal gray matter reduces the pressor response to glutamate injected at the same site. *Brasilian J Med Biol Res* **23**, 705-708, 1990.

BEART,P.M.; NICOLOPOULOS,L.S.; WEST,D.C.; HEADLEY,P.M. Na excitatory amino acid projection from ventromedial hypothalamus to periaqueductal gray in the rat: autoradiographic and eletrophysiological evidence. *Neuroscience Letters* **85**, 205-211, 1988.

BEATTY, J. **Principies of Behavioral Neuroscience**. Brown & Benchmark (Publishers) Kerper Boulevard, Dubuque, 1995

BECHARA, A., DAMASIO, H., TRANEL, D.; DAMASIO, A. Deciding advantageously before knowing the advantageous strategy. *Science* **275**, 1293-1294, 1997.

- BEHBEHANI, M.M. Funcional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Progress in Neurobiology* **46**, 575-605, 1995.
- BEITZ, A.J. The midbrain periaqueductal gray in the rat.I. Nuclear volume, cell number, density, orientation, and regional subdivisions. *Jornal of Comparative Neurology* **237**, 445-459, 1985.
- BEITZ, A.J. The Human Nervous system. San Diego: Academic Press.1990. 307 Central Gray.
- BEITZ, A.J. & SHEPARD, R.D. The midbrain periaqueductal gray in the rat .II. A golgi analysis. *Jounal Comparative Neurology* **237**, 460-475, 1985.
- BLANCHARD, D.C. & BLANCHARD, R.J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Ann Rev Psychol* **39**, 43-68, 1988.
- BLANCHARD, R.J. & BLANCHARD, D.C. Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *J Comp Physiol Psychol* **68**, 129-135, 1969.
- BLISS, T. & LOMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anesthetised rabbit following stimulation of perforant path. *J Physiol* **232**, 331-356, 1973.
- BOTTJER, S. & ARNOLD, A. Developmental plasticity in neural circuits for a learned behavior. *Annu Rev Neurosci* **20**, 459-481, 1997.

- CAMERON, A.A., KHAN, I.A., WESTLUND, K.N., CLIFFER, K.D.; WILLIS, W.D. The efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: a phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study.I. Ascending projections. *Journal of Comparative Neurology* **351**, 568-584, 1995.
- CAROBREZ, A.P. Excitatory amino acid mediation of defense reaction. *Neurosciences & Behavior* 81-94, 1987.
- CARRIVE, P., DAMPNEY, R.A.; BANDLER, R. Excitation of neurons in a restricted portion of the midbrain periaqueductal grey elicits both behavioral and cardiovascular components of the defense reaction in the unanesthetized decerebrate cat. *Neuroscience Letters* **81**, 273-278, 1987.
- CLEMENTS, J.R., MADL, J.E., JOHNSON, R.L., LARSON, A.A.; BEITZ, A.J. Localization of glutamate, glutaminase, aspartate and aspartate aminotransferase in the rat midbrain periaqueductal gray. *Exp Brain Res* **67**, 594-602, 1987.
- COLLINGRIDGE, G.L. & BLISS, T.V.P. NMDA receptors- their role in long-term potentiation. *TINS* **10**, 288-293, 1987.
- COLLINGRIDGE, G.L., KEHL, S.J.; MCLENNAN, H. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *Journal of Physiology* **334**, 33-46, 1983.

CRANE, B., ARVAI, A.S., GACHHUI, R., WU, C., GHOSH, D.K., GETZOFF, E.D., STUEHR, D.J.; TAINER, J.A. The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes. *Science* **278**, 425-1997.

CRUZ, A.P.M., FREI, F.; GRAEFF, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **49**, 171-176, 1994.

DAVIS, H.P. & SQUIRE, L.R. Protein synthesis and memory: A review. *Psychological Bulletin* **96**, 518-559, 1984.

DEAKIN, J.W.F. & GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defense. *J. Psychopharmacol.* **5**, 305-315, 1991.

FANSELOW, M.S. What is conditioned fear? *Trends in Neurosciences* **7**, 460-462, 1986.

FANSELOW, M.S. Fanselow, M.S. editor. The midbrain Periaqueductal Grey Matter. New York: Plenum. 1991. 151 the midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety.

FARDIN, V.; OLIVERAS, J.L.; BESSON, J. M. A reinvestigation of the analgesic effects induced by stimulation of the periaqueductal gray matter in the rat. I. The production of behavioral side effects together with analgesia. *Brain Research* **105**, 125-139, 1984.

FERREIRA, M.B.C.; WOLFMAN, C.; WALZ, R.; Da SILVA, R.C.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. NMDA- dependent, GABA-A- sensitive role of the entorhinal cortex in post-training memory processing. *Behavioural Pharmacology* **3**, 387- 394, 1992.

FILE, S.E. & ZANGROSSI, H. 'One trial tolerance' to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? *Psychopharmacology* **110**, 240-244, 1993.

FLETCHER, P.C., FRITH, C.D.; RUGG, M.D. The functional neuroanatomy of episodic memory. *TINS* **20**, 213-233, 1997.

GEWIRTZ, J.C. & DAVIS, M. Second-order fear conditioning prevented by blocking NMDA receptors in amygdala. *Nature* **388**, 471-474, 1997.

GIBBS, M.E. & NG, K.T. Psychobiology of memory: Towards a model of memory formation. *Biobehavioral Reviews* **1**, 113-136, 1977.

GOLD, P.E.; DELANOY, R.L. ACTH modulation of memory storage processing. In: Martinez, J.L.Jr.; JENSEN, R.A.; MESSING, R.B.; RIGTER, H.; McGAUH, J.L. eds. Endogenous peptides and learning and memory processes. New York, Academic Press, 79- 98, 1981.

GOLDMAN, D. High anxiety. *Science* **274**, 1483-1486, 1996.

GONZALES, L.E. & FILE, S.E. A five minute experience in the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. *The Journal of Neuroscience* **17**, 1505-1511, 1997.

GRAEFF, F.G., GUIMARAES, F.S., ANDRADE, T.G.C.S.; DEAKIN, J.W.F. Role of 5-HT in Stress, Anxiety, and Depression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **54**, 129-141, 1996.

GRAEFF, F.G., VIANA, M.B.; MORA, P.O. Opposed regulation by dorsal raphe nucleus 5-HT pathway of two types of fear in the elevated T-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **53**, 171-177, 1996.

GRAEFF, F.G., VIANA, M.B.; TOMAZ, C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Brasilian J Med Biol Res* **26**, 67-70, 1993.

GRAEFF, F. G.; FERREIRA NETTO, C.; ZANGROSSI Jr., H. The elevated T-maze as na experimental model of anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **23**, 237- 246, 1998.

GREENAMYRE, J.T. & PORTER, R.H.P. Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. *Neuroroly* **44**, 7-13, 1994.

GRIEBEL, G., RODGERS, R.J., PERRAULT, G.; SANGER, D.J. Risk assessment behaviour: Evaluation of utility in the study od 5-HT-related drugs in the rat

elevated plus-maze test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **57**, 817-827, 1997.

GUIMARÃES, F.S., AGUIAR, J.C., DEL BEL, E.A.; BALLEJO, G. Anxiolytic effect of nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the dorsal central grey. *NeuroReport* **5**, 1929-1932, 1994.

GUIMARAES, F.S., CAROBREZ, A.P., DE-AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F.G. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptors antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal gray. *Psychopharmacology* **103**, 91-93, 1991.

HAEFELY, W., KYBURZ, E., GERECKE, M.; MÖHLER, H. Recent advances in the molecular pharmacology of benzodiazepine receptors and in the structure activity relationship of their agonists and antagonists. *Adv Drug Res* **14**, 165-322, 1985.

HANDEY, S.L. Serotonin in animal models of anxiety: The importance of stimulus and response. In: IDZIDOWSKI, C.; COWEN, P. J., eds. *Serotonin, sleep and mental disorder*. Petersfield: Wrightson Biomedical; 1991: 89 - 115.

HEBB, D.O. *The organization of behavior*. New York, John Wiley, 1949.

HÖLSCHER, C. Long-term potentiation: A good model for learning and memory? *Prog Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiat* **21**, 47-68, 1997.

IZQUIERDO, I. *Organização, consolidação, construção e reconstrução da memória*. Editora da UFRJ, Rio de Janeiro 1988.

IZQUIERDO, I. & MEDIANA, J.H. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiology of Learning and Memory* **63**, 19-32, 1995.

IZQUIERDO, I; MEDINA, J.H., IZQUIERDO, L.A., BARROS, D.M.; DE SOUZA, M.M.; MELLO E SOUZA, T. Short- and long-term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in the rat brain. *Neurobiology of Learning and Memory* **69**, 219-224, 1998.

JÜRGENS, U.; PRATT, R. Role of the periaqueductal gray in vocal expression of emotion. *Brain Research* **167**, 367-378, 1979.

JOHNSTON, D. A missing link? LTP and learning. *Neuroscience* **278**, 401-402, 1997.

KIM, J.J., DECOLA, J.P., LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; FANSELOW, M.S. N-methyl-D-aspartate receptor antagonist APV blocks acquisition but no expression of fear conditioning. *Behavioral Neuroscience* **105**, 126-133, 1991.

KIM, J.J. & FANSELOW, M.S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* **256**, 675-677, 1992.

KIM, J.J., FANSELOW, M.S., DECOLA, J.P.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Selective impairment of long-term but not short-term conditional fear by the NMDA antagonist APV. *Behavioral Neuroscience* **106**, 591-596, 1992.

KIM, J.J.; RISON, R.A.; FANSELOW, S. Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear. *Behavioral Neuroscience* **107**, n. 6, 1093-1098, 1993.

KOBAYASHI, K., MANABE, T.; TAKAHASHI, T. Presynaptic long-term depression at the hippocampal mossy fiber-CA3 synapse. *Science* **273**, 648-649, 1996.

KRIEGER, J.E. & GRAEFF, F.G. Defensive behavior and hypertension induced by glutamate in the midbrain central gray of the rat. *Braz J Med Biol Res* **18**, 61-67, 1985.

LASHLEY, K.S. The effects of strychnine and caffeine upon the rate of learning. *Psychobiology* **1**, 141-170, 1917.

LASHLEY, K.S. Anonymous Brain Mechanisms and Intelligence. Chicago: University of Chicago Press, 1929.

LASHLEY, K.S. Anonymous, 1998.

LEDOUX, J.E. Emotional memory systems in the brain. *Behavior Brain Research* **58**, 69-79, 1993.

LEDOUX, J.E. & MULLER, D. Emotional memory and psychopathology. *Phil Trans R Soc Lond B* **352**, 1719-1726, 1997.

LEE, E.H.Y., LEE, C.P., WANG, H.I.; LIN, W.R. Hippocampal CRF, NE, and NMDA system interactions in memory processing in the rat. *Synapse* **14**, 144-153, 1993.

LIEBMAN, J.M., MAYER, D.J.; LIEBESKIND, J.C. Mesencephalic central gray lesions and fear-motivated behavior in rats. *Brain Research* **23**, 353-370, 1970.

LOMO, T. Frequency potentiation of excitatory synaptic activity in the dentate area of the hippocampal formation. *Acta Physiol Scand* **68 (suppl. 277)**, -128, 1966.

LOMO, T. Frequency potentiation of excitatory synaptic activity in the dentate area of the hippocampal formation. *Acta Physiol Scand* **68**, 128-1998.

MANTYH, P.W. The midbrain periaqueductal gray in the rat, cat, and monkey: a Nissl, Meil, and Golgi analysis. *Journal of Comparative Neurology* **204**, 349-263, 1982.

MARTIN, K.C., CASADIO, A., ZHU, H., E, Y., ROSE, J.C., CHEN, M.; BAILEY, C. Synapse-specific, long-term facilitation of aplysia sensory to motor synapses: A function for local protein synthesis in memory storage. *Cell* **91**, 927-938, 1997.

McGAUGH, J.L. Modulation of memory storage processes. In *Perspectives of Memory Research*, eds. P. R. Solomon; G. R. Goethals, C. M. Kelley and B. R.

Stephens (Springer, New York), pp. 33-64, 1988

McGAUGH, J.L. Time dependent processes in memory storage, *Science* **153**, 1351-1358, 1966.

MELLER, S.T. & DENNIS, B.J. Efferent projections of periaqueductal gray in the rabbit. *Neuroscience* **40**, 191-216, 1991.

MISERENDINO, M.J.D., SANANES, C.B., MELIA, K.R.; DAVIS, M. Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiate startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Letters Nature* **345**, 716-718, 1990.

MIZUMORI, S.J.Y., CHANNON, V., ROSENZWEIG, M.R.; BENNET, E.L. Short- and Long- Term components of working memory in the rat. *Behavior Neuroscience* **101**, 782-789, 1987.

MONAGHAN, D. T.; COTMAN, C. W. The distribution of [^3H] kainic acid binding in rat CNS as determined by autoradiography. *Brain Research* **252**, 91- 100, 1982.

MONDADORI, C., ORTMANN, R., PETSCHKE, F., BUERKI, H., D'AMATO, F.,

MEISBURGER, J.; FAGG, G. Task-dependent impairment or facilitation of learning by NMDA receptor blockade. *Frontiers in Excitatory Amino Acid Research* 419-426, 1988.

- MONDADORI, C. & WEISKRANTZ, L. NMDA receptor blockers facilitates and impair learning via different mechanisms. *Behavioral and Neural Biology* **60**, 205-210, 1993.
- MONTGOMERY, K.C. Exploratory behavior and its relation to spontaneous alternation in a series of maze exposures. *J Comp Physiol Psychol* **45**, 50-57, 1952.
- MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psych* **48**, 254-260, 1955.
- MONTGOMERY, K.C. & MONKMAN, J.A. The relation between fear and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol* **48**, 132-136, 1955.
- MORRIS, R.G.M., ANDERSON, E., LYNCH, G.S.; BAUDRY, M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP-5. *Nature* **319**, 774-776, 1986.
- MULLER, D., JOLY, M.; LYNCH, G. Contributions of quisqualate and NMDA receptors to the induction and expression of LTP. *Science* **242**, 1694-1697, 1988.
- MURPHY, G.G. & GLANZMAN, D.L. Mediation of classical conditioning in *Aplysia californica* by long-term potentiation of sensorimotor synapses. *Science* **278**, 467-471, 1997.

PAAS, Y. The macro- and microarchitectures of ligant-binding domain of glutamate receptors. *Trends Neurosci* **21**, 117-125, 1998.

PAXINOS, G. & WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press; 1986.

PAXINOS, G. & WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press. 1986.

PLIHAL W. BORN J. Memory consolidation in human sleep depends on inhibition of glucocorticoid release. *Neuroreport* **10**, 2741-2747, 1999

PORSOLT, R.; ROUX, S.; LENÈGRE, A. Critical issues in cognition enhancing drug research. In: *Strategies for Studying Brain Disorders. Vol.2. Schizophrenia Disorders* (Eds T. Palomo, T Archer and R Beninger), 285- 297. Complutense, Madrid, and Farrand, London, 1994.

RICHTER-LEVIN, G., ERRINGTON, M.L., MAEGAWA, H.; BLISS, T.V.P. Activation of metabotropic glutamate receptors is necessary for long-term potentiation in the dentate gyrus and for spacial learning. *Neuropharmacol* **33**, 853-857, 1994.

RODGERS, R.J. & COLE, J.C. Cooper SJ, Hendrie CA, editors. *Ethology and Psychopharmacology*. New York: John Wiley. The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology. 9-44, 1994.

RODGERS, R.J. & SHEPHERD, J.K. Influence of prior maze experience on behaviour and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice. *Psychopharmacology* **113**, 237-242, 1993.

RODGERS, R.J.; DALVI, A. Anxiety, defence and elevated plus- maze. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **21**, n.6, 801-810, 1997

SAKUMA, Y.; PFAFF, D. W. Mesencephalic mechanisms for integration of female reproductive behavior in the rat. *Am. J. Physiol.* **237**, 285-290, 1979.

SANSON & CAROBREZ. Long-lasting inhibitory avoidance acquisition in rats submitted to the elevated T- maze task. *Behav. Brain Res.* **101**, 59-64, 1999.

SPEAR, N.E.; MUELLER, C.W. Consolidation as a function of retrieval. In: WEINGARTEN, H.; PARKER, E.S. eds. Memory consolidation - Psychobiology of cognition: Hillsdale, Lawrence Erlbaum, 111- 47, 1984.

STREIT, W. & KINCAID-COLTON, C.A. The brain's immune system. *Scientific American* 38-43, 1995.

TREIT, D., MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* **44**, 463-469, 1993.

VIANA, M.B., GRAEFF, F.G.; LÖSCHMANN, P. Kainate microinjection into the dorsal raphe nucleus induces 5-HT release in the amygdala and periaqueductal gray.

***Pharmacology Biochemistry and Behavior* 58, 167-172, 1997.**

VIANA, M.B., TOMAZ, C.; GRAEFF, F.G. The elevated T-maze: A new animal model of anxiety and memory. ***Pharmacology Biochemistry and Behavior* 49, 549-554, 1994.**

WATTS, M.E. & MARK, R.F. Drug inhibition of memory formation in chickens. II. Short-term memory. ***Proceedings of the Royal Society: Series B* 178, 455-464, 1971.**

WALKER, D. L. & GOLD, P.E. Effects of de novel NMDA antagonist, NPC 12626, on long-term potencioniation, learning and memory. ***Brain Res.* 549, 213-221, 1991.**

ZANGROSSI JR, H. & GRAEFF, F.G. Behavioral valldation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. ***Brain Research Bulletin* 44, 1-5, 1997.**

ZOLA-MORGAN, S., SQUIRE, L.R., ALVAREZ-ROYO, P.; CLOWER, R.P. Independence os memory functions and emotional behavior: separat contribuitlons of the hippocampal formation and the amygdala. ***Hippocampus* 1, 207-220, 1991.**

ZOLA-MORGAN, S., SQUIRE, L.R.; AMARAL, D.G. Human amnesia and the medial temporal region: Enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to CA1. ***Neurosci* 6, 2950-2967, 1986.**

ANEXOS

ANEXOS (TABELAS)

Tabela 2: Efeito do antagonista do receptor NMDA (AP-5) na esQUIVA inibitória, expresso como medida de latência (média \pm epm), com microinjeção pré-aquisição

Droga	EsQUIVA 1	EsQUIVA 2	EsQUIVA 3	EsQUIVA 4	n
Líquor (controle)	18,0 \pm 5,0	146,0 \pm 35,0	266,0 \pm 23,0	281,0 \pm 18,0	13
AP-5 (nmol)					
3	32,30 \pm 8,6	158,20 \pm 45,0	222,60 \pm 40,0	221,00 \pm 42,8	9
6	12,0 \pm 2,8	83,6 \pm 32,0	198,0 \pm 46,0 *	176,5 \pm 48,8 *	9
12	106,6 \pm 48,0 *	67,0 \pm 31,0 *	165,0 \pm 43,0 *	43,0 \pm 14,0 * #	9

(*) Diferença significativa na comparação com controle; (#) Diferença significativa entre as sessões 3 e 4. Teste ANOVA de duas vias e *post-hoc* LSD, $p < 0,05$.

Tabela 3: Efeitos do antagonista do receptor NMDA (AP-5) na avaliação do risco, no labirinto em T elevado, expresso como medida de latência (média \pm epm), com microinjeção pré-aquisição, verificado pelo teste ANOVA de duas vias, *post-hoc* LSD

Droga	Sessão 1	Sessão 2	Sessão 3	Sessão 4	n
Líquor (Controle)	78 \pm 19	49,5 \pm 13	9,0 \pm 2,3	12,5 \pm 7,5	13
AP-5 (nmol)					
3	31,9 \pm 17 *	34,8 \pm 11,7	9,0 \pm 4,5	50,8 \pm 35,9	9
6	3,7 \pm 3,7 *	23,2 \pm 8	7,0 \pm 2,6	37 \pm 9,5 *	9
12	16,2 \pm 15 *	22,9 \pm 11 *	29,6 \pm 12	111,8 \pm 22 *	9

(*) Diferença significativa na comparação com controle. Teste ANOVA de duas vias e *post hoc* LSD, $p < 0,05$.

Tabela 4: Comportamento de fuga dos braços abertos do LTE, expresso como medida de latência (média \pm epm), com microinjeção pré-aquisição.

Droga	Fuga 1	Fuga 2	n
Líquor (controle)	15,0 \pm 2,0	8,0 \pm 2,0	13
AP-5 (nmol)			
3	18,50 \pm 2,2	10,70 \pm 3,70	9
6	18,4 \pm 3,4	8,1 \pm 1,0	9
12	70,4 \pm 30,0 *	20,0 \pm 8,0 *	9

(*) Diferença significativa na comparação com controle. Teste ANOVA e *post-hoc* LSD, $p < 0,05$.

Tabela 5: Efeito do antagonista do receptor NMDA (AP-5) na esQUIVA inibitória no labirinto em T elevado, expresso como medida de latência (média \pm epm), com microinjeção pós-aquisição

Droga	EsQUIVA 1	EsQUIVA 2	EsQUIVA 3	EsQUIVA 4	n
Líquor (controle)	37,1 \pm 11,7	142,0 \pm 37,0	280,7 \pm 19,3	300,0 \pm 0,0	14
AP-5 (nmol)					
3	21,7 \pm 3,8	122,5 \pm 44,8	203,9 \pm 38,9	204,2 \pm 47,9 *	09
6	19,0 \pm 6,1	148,0 \pm 48,0	273,0 \pm 27,0	171,5 \pm 43,0 * #	13
12	18,5 \pm 4,5	111,3 \pm 38,8	269,8 \pm 25,6	292,7 \pm 7,3	11

(*) Representam diferença significativa na comparação com controle, (#) diferença entre sessões 3 e 4. Teste ANCOVA e *post-hoc* LSD $p < 0,05$.

Tabela 6: Efeitos do antagonista do receptor NMDA (AP-5) na avaliação do risco no labirinto em T elevado, expresso como medida de latência (média \pm epm), com microinjeção pós-aquisição

Droga	Sessão 1	Sessão 2	Sessão 3	Sessão 4	n
Líquor (controle)	26,1 \pm 8,7	30,8 \pm 8,8	10,7 \pm 4,9	7,6 \pm 1,6	13
AP-5 (nmol)					
3	23,3 \pm 8,4	48,4 \pm 18,3	6,3 \pm 3,6	21,0 \pm 15,3	09
6	17,6 \pm 7,3	21,8 \pm 8,1	8,6 \pm 4,0	36,5 \pm 13,3	13
12	68,0 \pm 30,9	38,9 \pm 11,0	15,7 \pm 5,7	76,2 \pm 59,7 *	11

(*) Representam diferença significativa na comparação com controle, (#) diferença entre sessões 3 e 4. Teste ANCOVA e *post hoc* LSD $p < 0,05$.

Tabela 7: Resposta de fuga dos braços abertos do LTE, em teste realizado 72 horas após a sessão de aquisição, expressada como medida de latência (média \pm epm), com microinjeção pós-aquisição.

Droga	Fuga 2 (sem droga)	n	Fuga 2 (com droga)	n
Líquor (controle)	8,9 \pm 2,5	13	12,0 \pm 0,9	9
AP-5 (nmol)				
3	5,1 \pm 0,7	9	22,3 \pm 4,2	11
6	9,7 \pm 1,5	13	22,6 \pm 9,8	7
12	10,0 \pm 2,0	11	13,7 \pm 7,8	7

* Diferença significativa entre fuga 1 e 2 (ANOVA F(3,40)= 4,14, $p < 0,05$)

+ Diferença significativa na comparação com controle (ANOVA F(1,40)= 30,18 $p < 0,001$). *Pos-hoc* LSD

Tabela 8: Efeitos do antagonista do receptor NMDA (AP-5) na esquiiva inibitória no labirinto em T elevado, expresso como medida de latência (média \pm epm), com microinjeção pré teste

Droga	Esquiiva 1	Esquiiva 2	Esquiiva 3	Esquiiva 4	n
Líquor (controle)	13,2 \pm 3,0	85,5 \pm 33,0	300,0 \pm 0,0	300,0 \pm 0,0	9
AP-5 (nmol)					
3	17,0 \pm 2,5	119,9 \pm 37,0	258,6 \pm 26,3	255,9 \pm 29,9	11
6	28,0 \pm 6,6	151,2 \pm 49,0	237,8 \pm 40,0	91,2 \pm 43,0 * #	6
12	15,8 \pm 3,8	113,1 \pm 48,8	156,5 \pm 51,0	30,5 \pm 19 * #	7

(*) Diferença significativa na comparação com controle; (#) Diferença significativa entre as sessões 3 e 4; Teste ANCOVA e *post-hoc* LSD, $p < 0,05$.

Tabela 9: Efeito do antagonista do receptor NMDA (AP-5) na avaliação do risco, expresso como medida de latência (média \pm epm), com microinjeção pré-teste

Droga	Esquiiva 1	Sessão 2	Sessão 3	Sessão 4	n
Líquor (controle)	55,5 \pm 26	35,9 \pm 13	6,3 \pm 2,4	9,6 \pm 2,1	9
AP-5 (nmol)					
3	35,2 \pm 12	47 \pm 22	12,9 \pm 7	22,1 \pm 7,5	11
6	6,9 \pm 6,9	20,6 \pm 8,9	8,6 \pm 4,3	30,3 \pm 9,4	6
12	5,9 \pm 5,9	9,9 \pm 6,4	25,2 \pm 9,5	69,2 \pm 22 * #	7

(*) Diferença significativa na comparação com controle; (#) Diferença significativa entre as sessões 2 e 3. Teste ANCOVA e *post-hoc* LSD ($p < 0,05$)